

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Louis FONTAINE
Pharmacien

Première thèse

**RECHERCHES SUR DE NOUVELLES PROPRIÉTÉS
PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES
DE MOLÉCULES APPARTENANT A LA
SÉRIE DES COUMARINES**

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 29 Juin 1968 devant la Commission d'Examen

MM. G. PERES

Président

B. DREVON

G. FAUCON

R. FONTANGES.....

} Examineurs

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Louis FONTAINE

Pharmacien

Première thèse

**RECHERCHES SUR DE NOUVELLES PROPRIÉTÉS
PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES
DE MOLÉCULES APPARTENANT A LA
SÉRIE DES COUMARINES**

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 29 Juin 1968 devant la Commission d'Examen

MM. G. PERES

Président

B. DREVON

G. FAUCON

R. FONTANGES.....

} Examineurs

THÈSES

LOUIS FONTAINE

Pharmacien



RECHERCHES SUR LES NOUVELLES PROPRIÉTÉS
PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES
DE MOLECULES APPARTENANT A LA
SÉRIE DES COUMARINES

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

présentées en vue de la thèse de Doctorat en Pharmacie

MM. G. PÉREZ, J. VAN DER WOUDE, J. VAN DER WOUDE,
B. DREYER, J. VAN DER WOUDE, J. VAN DER WOUDE,
A. FAUON, J. VAN DER WOUDE, J. VAN DER WOUDE,
R. FONTAINE, J. VAN DER WOUDE, J. VAN DER WOUDE

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MOUSSA, JAFFARD,
EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET, AUMENAS.

Doyen

M. BRACONNIER.

Assesseurs

MM. DAVID, BOIDIN.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER	Géologie
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
CUEILLERON	Chimie
EYRAUD	Chimie minérale
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHER	Chimie industrielle
PAVANS de CECCATTY	Zoologie

MM.	MERLIN	Chimie analytique
	DUFAY	Physique de l'Atmosphère
	PHILBERT	Physique
	COHEN-ADAD	Chimie
	DAVID	Géologie
	CHANEL	Psychophysiologie
	MAURY	Méthodes Mathématiques de la Physique
	DEPRAZ	Physique nucléaire
	GAUTHIER	Chimie
	GAUME	Physique
	UZAN	Physique
	LEGAY	Biologie animale
	LAFORGUE	Physique
	GERMAIN	Chimie
	CHENEVOY	Pétrographie
	BIGAY	Astronomie
Mme	ERICSON	Physique

Professeurs sans chaire

MM.	FERON	Mathématiques
	GINET	Zoologie
	ASCH	Physique
	MICHEL	Minéralogie
Mlle	MAITROT	Physique
	GEVIN	Géologie
	PONASSE	Mathématiques
	d'INCAN	Physique C.S.U.
	LEFEBVRE	Mathématiques
	PERNET	Mathématiques
	CHERY	Physique
	BERGEON	Physique C.S.U.
Mlle	GAUTHERON	Chimie biologique
	DESCOTES	Chimie organique
	ERBEIA	Physique
	LEMOIGNE	Botanique
	MARTEL	Mécanique
	MICHEL	Biochimie
	PICARD	Mathématiques
	LEBRETON	Biologie végétale
	TOUSSET	Chimie
	COMBET	Mathématiques

Maîtres de Conférences

MM.	DEMARCO	Géologie
	DAVID	Biologie animale
	SCHMITT	Physique
	LAURENT	Chimie organique
	ROT	Mathématiques
	BETHOUX	Mathématiques
	GUSAKOW	Physique
Mlle	THOMAS	Chimie minérale
	BUCHWALTER	Mathématiques C.S.U.
	BOUZON	Mathématiques C.S.U.
	COSNIER	Psychophysiologie
Mlle	LAMOURE	Biologie végétale
	PORTHAULT	Chimie C.S.U.
	VALLET	Chimie macromoléculaire
	HAUGAZEAU	Mathématiques
	ENAY	Géologie
	BERTHET	Biologie végétale
	BRUN	Biologie animale
	DELMAU	Physique
	EL BAZ	Physique - Electricité
	FONTANGES	Physiologie
	HUET	Chimie
	REMOND	Mathématiques C.S.U.
	JANIN	Mathématiques
	RUHLA	Physique
	DUPUY	Physique
	CHASTRETTE	Chimie
	PARIS	Chimie
	DAILLIE	Biologie animale
	LARPENT	Biologie végétale
Mlle	WORBE	Physiologie
	HOLLEY	Psychophysiologie
	BURQ	Physique
	ROUX	Biologie animale

Maître de Conférences adjoint

M.	PIERRON	Chimie
----	---------	--------

Conseiller administratif

M.	BURNET
----	--------

Secrétaire principal honoraire

M.	ROUX.
----	-------

Personnels exerçant leurs fonctions

à l'I.N.S.A. de LYON

Directeur

M. BONVALET.

Professeurs

MM. GELIN	Chimie organique
ARNAL	Electronique
PEYRON	Chimie-Physique
EYRAUD	Electricité - Electrotechnique
LAVIOLETTE	Biologie animale
PACHECO	Chimie biologique
PERNOUX	Optique
ROLIN	Thermodynamique chimique
	Physique de la matière

Maîtres de Conférences

MM. BOUSQUET	Chimie minérale
CHEVRETON	Chimie
CLAUDEL	Chimie
CRONENBERGER	Chimie biologique
DUC-MAUGE	Chimie
GOBIN	Métallurgie
GODET	Mécanique
GOLE	Chimie macromoléculaire
GOUTTE	Electricité - Electronique
GUILLAUD	Electricité - Electronique
GUITTARD	Physique
JOUBERT	Mécanique
LAFON	Méthématiques
LALANNE	Mathématiques
LESPINASSE	Génie chimique
MONNIER	Chimie des Métaux
PETIT	Electrotechnique
PINARD	Physique de la Matière
RICHARD	Electricité - Electronique
RIVIERE	Cristallographie
ROBIN	Chimie industrielle
SALLES	Mécanique
SICARD	Mécanique
STOEBER	Microbiologie.

I.U.T. de LYON et de SAINT-ETIENNE

I.U.T. - LYON

Directeur

M. FEUVRAIS.

Professeur

M. FEUVRAIS Physique

Maîtres de Conférences

MM. POUYET
VILLE Photochimie
Biologie appliquée

Maître de Conférences associé

I.U.T. - SAINT-ETIENNE

Directeur

M. MERLIN

Maître de Conférence

M. DAILLER Physique

Personnels exerçant leurs fonctions
à l'Ecole Centrale Lyonnaise

Professeur sans chaire

M. MATHIEU Mécanique des Fluides

Maître de Conférences

Mlle COMTE-BELLOT Mécanique des Fluides

Maître de Conférences associé

M. MOIROUX Mécanique appliquée.

D E D I C A C E

A ma Femme

A ma Famille

A mon Equipe, et particulièrement à mes Collaborateurs :

- M. GRAND Marcel
- Mme QUENTIN Yvette
- Mme MERLE Suzel.

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. PERES

Professeur de Physiologie à la Faculté des Sciences de LYON

J'ai été à plusieurs titres son élève. Ses conseils m'ont toujours été très précieux. Il m'a guidé dans la conception et la présentation de ce travail, avec beaucoup de bienveillance. Il m'a fait l'honneur d'être mon Président de thèse.

A MES JUGES

Monsieur le Professeur B. DREVON

Professeur à la Faculté Mixte de Médecine et Pharmacie de LYON

Il m'a accueilli dans son laboratoire où j'ai commencé mes recherches dans le domaine de la pharmacologie. Les bases de ce travail ont été jetées à ce moment. Par la suite, j'ai toujours trouvé auprès de lui les meilleurs conseils sur l'orientation de mes activités.

Monsieur le Professeur G. FAUCON

Professeur de Pharmacologie à la Faculté Mixte de Médecine et Pharmacie de LYON

Ses connaissances approfondies dans le domaine de la pharmacodynamie m'ont été souvent d'un grand secours.

Monsieur le Professeur R. FONTANGES

Maître de Conférences

Chaire de Physiologie de la Faculté des Sciences de LYON

Il m'a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

A MON DIRECTEUR DE RECHERCHES

Monsieur A. DANSETTE
Docteur ès-Sciences

Il a guidé mes premiers pas dans la Recherche Appliquée.
Il m'a autorisé à conduire à bonne fin ce travail.
En témoignage d'admiration affectueuse.

A Monsieur E. BOSCHETTI
Ingénieur-Chimiste

Il a eu l'amabilité de me fournir la presque totalité des
molécules faisant l'objet de ce travail.

A V A N T - P R O P O S

On est frappé par l'extrême plasticité biologique des coumarines et des structures voisines dont la nature fournit tant de variantes et que le chimiste transforme à sa guise. Plus de 35 activités pharmacologiques différentes ont été trouvées à ce jour, parmi ces composés ; c'est assez dire la mine qu'ils représentent pour celui dont le sujet est de rechercher des médicaments nouveaux. Sur le plan biologique, l'activité anticoagulante par inhibition de la synthèse hépatique de la prothrombine domine le problème. Cette activité - largement distribuée dans la série - est gênante si l'on considère un développement possible des médicaments potentiels dans d'autres directions thérapeutiques. Notre travail contribue à vérifier l'intérêt de la dissociation des effets anticoagulants des autres activités pharmacologiques. L'idée avait déjà porté ses fruits dans des travaux antérieurs. Dans sa thèse, MOLHO (1953) - 1 - démontre la dissociation possible des effets anticoagulants et œstrogéniques dans les coumarines. En partant des anticoagulants déjà connus, et en particulier de la phényl 2 indane dione 1,3 dont les activités secondaires sont multiples, nous nous attacherons à préciser deux activités nouvelles : anti-inflammatoire et cholérétique. Nous rechercherons les conditions de la dissociation des effets anticoagulant et anti-inflammatoire d'une part, et des effets anticoagulant et cholérétique d'autre part.

Dans un premier chapitre, nous ferons le point bibliographique des activités pharmacologiques décrites des coumarines et structures voisines, afin de présenter nos résultats dans l'ensemble des faits déjà connus. Dans un deuxième chapitre, nous préciserons les structures chimiques douées d'activité anti-inflammatoire. Dans un troisième chapitre, nous ferons de même en ce qui concerne le pouvoir cholérétique. Dans un dernier chapitre, nous préciserons l'activité pharmacologique, cholérétique et spasmolytique oddienne d'une des structures retenues dans le chapitre précédent. Nous essaierons d'expliquer les modes d'action de ce dérivé coumarinique.

L'ensemble de ce travail représente l'essentiel de nos activités de recherche, commencées en 1957 dans le laboratoire du Professeur B. DREVON à la Faculté de Médecine et Pharmacie de LYON, et poursuivies dans le Centre de Recherches des Laboratoires LIPHA-OBERVAL à LYON.

CHAPITRE PREMIER

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

LES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DEJA ETUDIEES

DANS LA SERIE DES COUMARINES

ET HETEROCYCLES APPARENTES

Nous ferons le point des activités pharmacologiques démontrables sur l'animal et susceptibles d'une éventuelle application clinique. Il existe sur ce sujet une abondante littérature. Ce foisonnement a plusieurs causes, parmi lesquelles :

- la grande variété des coumarines obtenues du règne végétal,
- la réactivité chimique du noyau de base,
- l'impulsion donnée par la découverte du dicoumarol et de ses propriétés anticoagulantes.

Tout ceci explique l'intérêt précoce et soutenu des chimistes et pharmacologues pour cette série hétérocyclique.

Dans ce chapitre, nous décrirons, à titre de simple aide-mémoire, les principaux noyaux chimiques retrouvés au cours de l'étude.

Nous regrouperons par famille pharmacologique les activités décrites, en terminant par le pouvoir anticoagulant : à cette occasion, nous rappellerons les corps chimiques déclenchant chez les mammifères des effets hémorragipares, en précisant les relations entre la structure chimique et l'activité des molécules.

Cette description nous servira dans l'étude ultérieure d'autres effets associés : nous n'avons pu en effet contrôler le pouvoir anticoagulant sur l'animal de toutes les molécules examinées dans ce travail, manquant parfois d'une quantité suffisante de substance pure.

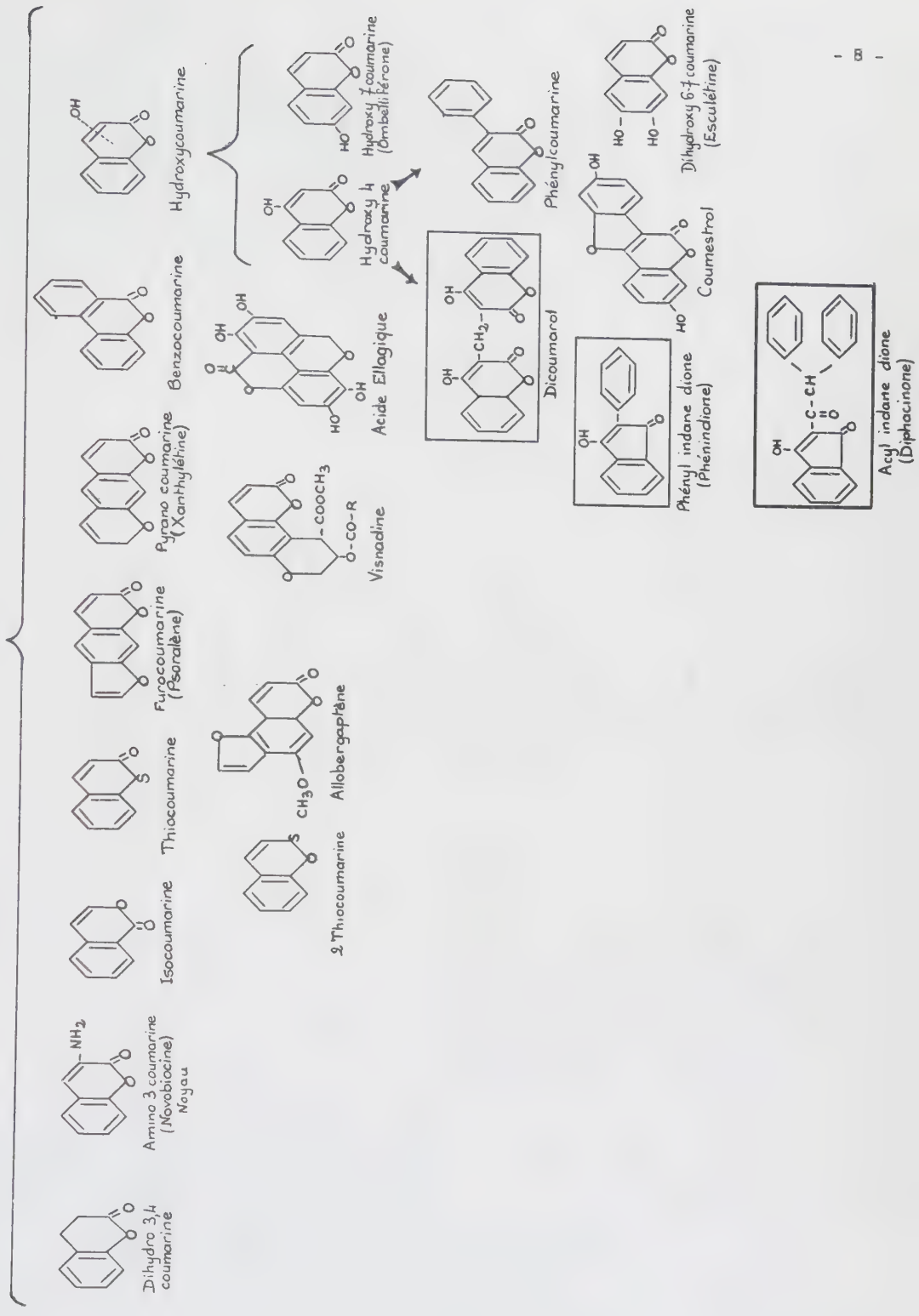
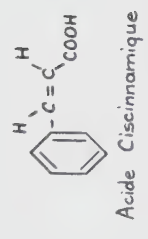
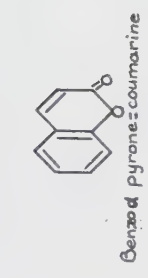
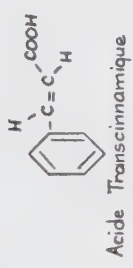
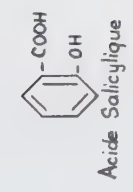
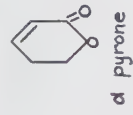
I - HETEROCYCLES DE BASE

La structure de ces colorants végétaux peut être ordonnée autour de quelques noyaux de base : l'alphapyrone et la gammapyrone. Nous y adjoindrons la parabenzoquinone qui donne des anticoagulants d'activité "coumarinique", et la vitamine K 1, dont procèdent ces anticoagulants par analogie structurale compétitive.

Autour de l'alphapyrone (Tableau 1) figure la benzoalphapyrone ou coumarine. Les anticoagulants les plus actifs se recrutent dans cette famille : dicoumarol et dérivés synthétiques non symétriques, indane diones, simplification de la molécule précédente, acyl indane diones qui en découlent.

Certaines des coumarines naturelles biologiquement les plus actives figurent dans ce tableau : l'antibiotique Novobiocine (amino coumarine), les psoralènes, absorbeurs d'ultra-violets conduisant à la pigmentation de l'épiderme, des vasodilatateurs coronariens comme la Visnadine, des œstrogènes comme le Coumestrol.

Hétérocycles dérivés de l'alphapyrone
Les anticoagulants sont encadrés

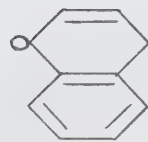


La gampapyrone est le chef de file (Tableau 2) des chromones, des xanthones, flavones et isoflavones qui communiquent aux fleurs les plus éclatantes colorations. Nous y joignons les anthocyanes et les tanins catéchiques. De rares structures anticoagulantes peu actives peuvent être signalées dans ce groupe.

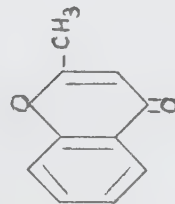
Hétérocycles dérivés de la gammapyrone
Les anticoagulants sont encadrés



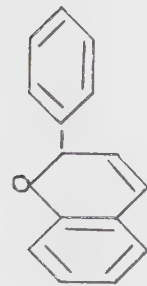
γ pyrone



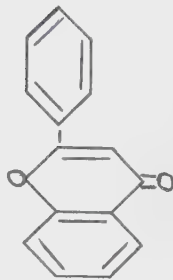
Chromène



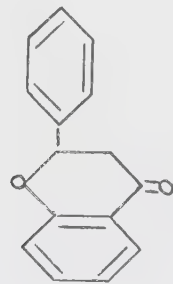
Chromone



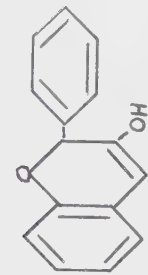
Flavène



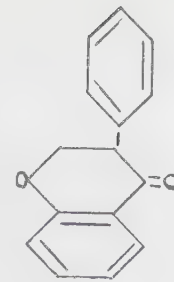
Flavone



Flavonone

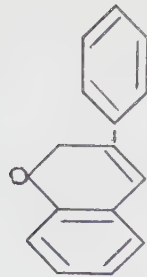


Anthocyanes

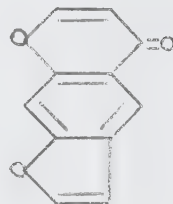


Isoflavone

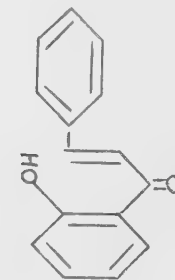
Isoflavène



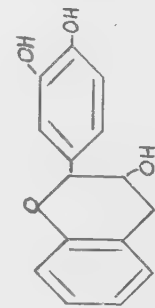
Isoflavanone



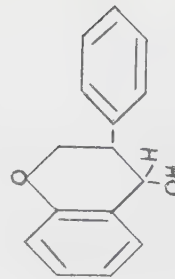
Furochromone
(Khelline)



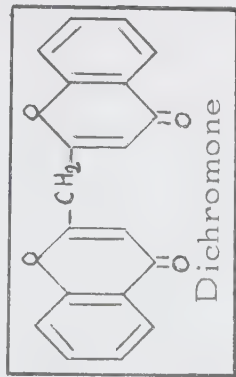
Oxychalcone
(Chalcones)



Tannin catéchique



Isoflavanol



Dichromone

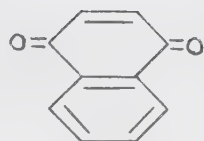
Les parabenzoquinones orientent vers les naphtoquinones et les phtiocols, fournisseurs d'anticoagulants à faible activité et surtout de la phytyl 2, méthyl 3 naphtoquinone 1,4 - vitamine K 1 - vitamine de la coagulation.

Tableau 3

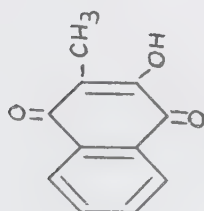
Structures quinoniques
Les anticoagulants sont encadrés



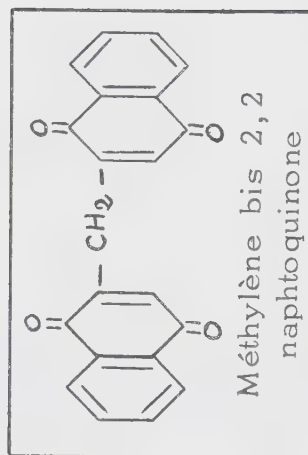
p.benzoquinone



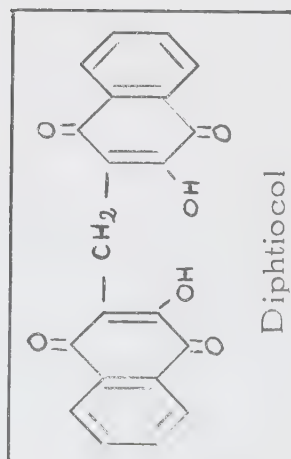
Naphtoquinone



Phthicol



Méthylène bis 2,2
naphtoquinone



Diphticol



Vitamine K 1

II - LES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DEJA ETUDIEES

Ce travail bibliographique est ordonné selon le plan suivant :

A - BIOSYNTHESE - METABOLISME - REVUES GENERALES

Réf. 1 à 36.

B - AGENTS CHIMIOOTHERAPEUTIQUES

- Bactéricides :

Réf. 37 à 68.

- Antifongiques :

Réf. 69.

- Virucides :

Réf. 70.

C - AGENTS ANTIPARASITAIRES

- Antimalariques :

Réf. 71.

- Anthelminthiques :

Réf. 20 - 21 - 23 - 24 - 27 - 28 - 29 - 30 - 72 - 73 - 74.

D - SYSTEME NERVEUX CENTRAL

- Analgésiques :

Réf. 25 - 75 à 82.

- Anticonvulsivants :

Réf. 83 - 84.

- Hypnotiques :

Réf. 7 - 22 - 26 - 31 - 33 - 85.

- Régulation thermique :

- . Hypothermisants
- . Hyperthermisants

Réf. 33 - 35 - 36 - 86 - 87 - 88.

- Sédatifs :

Réf. 7 - 26 - 32 - 34 - 89 - 90 - 91 - 92.

- Stimulants centraux :

Réf. 93 à 97.

E - SYSTEME RESPIRATOIRE

- Analeptiques respiratoires :

Réf. 93 - 95 - 98 à 100.

F - MUSCULATURE STRIEE

- Antivératriniques :

Réf 101.

- Curarisants :

Réf. 7.

G - PEAU

- Photosensibilisateurs épidermiques :

Réf. 7 - 102 à 120.

H - SPHERE SEXUELLE

- Contraceptifs :

Réf. 121 à 124.

- Oestrogènes :

Réf. 1 - 19 - 125 à 139.

I - CYTOGENETIQUE

- Radioprotecteurs :

Réf. 141 - 142.

- Cytostatiques :

Réf. 7 - 143 à 150.

J - EXCRETION URINAIRE

- Diurétiques :

Réf. 7 - 151 à 156.

- Uricosuriques :

Réf. 157 à 162.

K - MUSCULATURE LISSE

- Spasmolytiques :

Réf. 7 - 163 à 173.

- Antihistaminiques :

Réf. 174 à 177.

L - SYSTEME CIRCULATOIRE

. COEUR

- Antidigitoxines :

Réf. 178.

- Antiarythmiques :

Réf. 179.

- Coronarodilatateurs :

Réf. 169 - 180 à 201.

. ATHEROME et ANTICHOLESTEROL

Réf. 202 à 211.

. FRAGILISATION CAPILLAIRE et ANTIHYALURONIDASQUES

Réf. 212 à 228.

. HYPOTENSEURS

Réf. 177 - 229 à 234.

M - CRASE SANGUINE - COAGULATION

- Facteurs modifiant l'adhésivité plaquettaire :

Réf. 177 - 234.

- Hémostatiques :

Réf. 7.

- Anticoagulants :

Réf. 1 - 234 à 273.

Tableaux structure - action :

. Coumarines :

Réf. 1 - 260 - 264 - 274 à 280.

. Indane diones :

Réf. 1 - 265 - 278 - 279 à 284 - 289.

. Indane triones :

Réf. 1 - 262 à 264 - 274 - 285 à 288.

. Autres noyaux :

Réf. 1 - 268 - 274 - 285 - 286.

Nous nous proposons de nous étendre plus particulièrement sur ce dernier paragraphe.

A - BIOSYNTHESE - METABOLISME - REVUES GENERALES

Nous citerons d'abord quelques références de travaux faisant le point de nos connaissances sur la biosynthèse et le métabolisme de ces composés.

GRIESBACH et DOERK (1959) - 2 -, STOCKER et coll. (1962) - 3 -, ont montré que les coumarines, aglycones de glucosides végétaux trouvés essentiellement dans les familles des Orchidacées, des Légumineuses, des Ombellifères, des Rutacées et des Labiées, sont synthétisées par la plante à partir de l'acide phosphoénolpyruvique, la synthèse passant par les principaux stades suivants : acide 5 déhydroquinique, acide shikimique, acide phénylpyruvique, acide transcinnamique, acide coumarique, acide coumarinique et coumarine. Les acides ciscinnamiques donnent immédiatement la coumarine. Dans certains cas, la biosynthèse semble se faire par condensation de restes acétates : ce serait le cas du coumestrol, BIRCH (1957) - 4 -. La coumarine serait catabolisée dans la plante sous forme d'acide mélilotique (loc.cit.) - 3 -. Chez l'animal, où les structures coumariniques ne sont jamais naturelles, les métabolites urinaires indiquent que l'hétérocycle s'hydrolyse et donne en s'ouvrant de l'acide mélilotique et de l'acide orthocoumarique. La dégradation totale donne, chez le rat et le lapin, de l'acide orthohydroxyphénylacétique. Il semble qu'il existe une recyclisation partielle conduisant à des coumarines hydroxylées en 4 et en 7, BATH et coll. (1959) - 5 -.

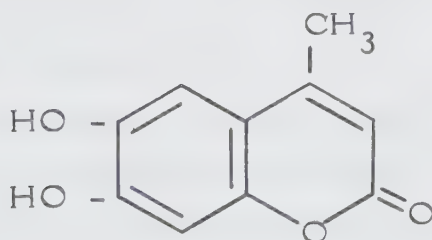
Les documents suivants permettent de récapituler rapidement les travaux plus anciens traitant de l'activité pharmacologique dans la série. Par exemple, PARIS (1951) - 6 - donne un résumé général des propriétés pharmacologiques des flavonoïdes. En 1953, MOLHO développe le point des connaissances particulièrement sur l'effet anticoagulant et œstrogène dans la série (loc.cit.) - 1 -. BOSE indique ultérieurement de façon succincte les propriétés biologiques des coumarines naturelles (1958) - 7 -.

Dans une série d'articles parue en 1959 et 1960, BOHM (1959 - 1960) - 8 à 18 - résume nos connaissances dans le domaine des flavones. Dernièrement, SOINE donne 368 références sur le même problème en ce qui concerne les coumarines (1964) - 19 -. Enfin, l'équipe japonaise de ITO et KITAGAWA, sous le générique de "Coumarins for medicinal purposes" a développé des recherches originales dans diverses directions pharmacologiques. Les nombreuses références correspondantes seront données plus loin, mais l'ensemble des considérations introductives forme une somme à caractère général très utile pour le chercheur (1950 - 1951 - 1953 - 1954 - 1956 - 1957 - 1960) - 20 à 36 -.

B - AGENTS CHIMIOThERAPEUTIQUES

Les dérivés de la série ont été étudiés comme bactéricides, antifongiques et virucides.

- Le courant de recherches le plus actif couvre le domaine des activités antimicrobiennes. GOTH (1945) - 37 - montre l'activité bactéricide in vitro du dicoumarol à la fois sur les germes gram⁺ et gram⁻ (Brucella, Escherichia et Salmonella). Le produit est actif jusqu'à la concentration de 1×10^{-5} dans le milieu liquide de développement des germes. La vitamine K 1 n'a pas d'effet antagoniste. La même année, DE LARCERDA - 38 - confirme ces résultats sur les germes gram⁺ surtout sur le staphylocoque et le streptocoque. Le dicoumarol est efficace jusqu'à la concentration de $0,5 \times 10^{-5}$. BRODERSEN et KJAER (1946) - 39 - testant l'activité bactéricide de substances naturelles sur 25 souches pathogènes, confirment l'effet du dicoumarol, actif sur le Bacillus anthracis à $0,5 \times 10^{-6}$. Les auteurs constatent qu'il existe très souvent dans ces principes actifs végétaux, une lactone insaturée. Le dicoumarol voit son effet inhibé par la cystéine, ce qui n'est pas le cas de la 4 méthylesculétine.



NAGHSKI et coll. (1947) - 40 - recherchent l'activité bactéricide des flavones naturelles. La Quercétine, la plus efficace in vitro, est bactériostatique à la concentration de 1×10^{-7} . Il existe pour ces auteurs un certain niveau d'inhibition de l'effet bactéricide des structures coumariniques par les α pyrones. Reprenant ce travail, JHAVERI, KHORANA et MOTIWALA (1950) - 41 - ne retrouvent pas ce pouvoir antiseptique parmi les flavones (essai contre Salmonella et Staphylococcus). Dans une revue générale faisant le point sur le sujet, GABEL (1948) - 42 - confirme l'activité des structures dérivées de la α pyrone (flavones). SCHRANF-STATTER (1948) - 43 - étend ces résultats positifs aux chalcones et aux flavonones. La flavonone est bactériostatique vis-à-vis du Staphylocoque in vitro. Complétant ces résultats, l'auteur précise (1949) - 44 - que la 2,2' dihydroxy 3 5 5' tribromochalcone est la plus efficace dans la série, tuant in vitro le Staphylocoque à la concentration minimale de $0,6 \times 10^{-6}$.

CAVALLITO (1951) - 45 - émet l'hypothèse que ces dérivés des pyrones, qui ont un caractère lipophylique accusé comme le dicoumarol, agissent pour cette raison spécialement sur les germes gram⁺. DUQUENOIS et GREIB (1956) - 46 - montrent que l'ombelliférone ou hydroxy 7 coumarine est le principe actif anti-brucellique expliquant les résultats favorables qu'ils obtiennent en traitant la fièvre de Malte avec des extraits de Piloselle. L'acide caféique, structure cinnamique en relation avec les coumarines, est aussi efficace in vitro contre Brucella abortus bovis.

VIRTANEN (1958) - 47 - introduit dans cette recherche la notion d'antibiotique en précisant que le trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.) contient une isoflavone qui protège la plante contre l'attaque de certains germes. Cette substance est l'hydroxy 7 méthoxy 4' isoflavone ou pratol. Dans ces dernières années, la recherche des coumarines naturelles bactéricides reste toujours active : CHAKRABORTY, MIRA et BOSE (1961) - 48 - trouvent l'ombelliférone et le psoralène très faiblement actifs parmi 17 congénères. UKITA et EJIMA (1962) - 49 - démontrent une activité importante de l'acétyl 3 hydroxy 4 coumarine sur *Lactobacillus arabinosus* et précisent (1962) - 50 - que le découplage des phosphorylations oxydatives peut expliquer cet effet. REPPEL et SCHMOLLACK (1964) - 51 - préparent des dérivés synthétiques antimicrobiens potentiels : acylamino coumarines et sulfanilamido coumarines. DADAK et HODAK (1966) - 52 - retrouvent récemment l'inhibition de la croissance des germes gram⁺ pour le dicoumarol et l'ostruthin (geranyl 6 hydroxy 7 coumarine). Les furano coumarines semblent dénuées d'action.

Aucune des recherches précédentes n'a conduit à des drogues utilisables en thérapeutique des maladies infectieuses. Une seule coumarine cependant a fait exception. En 1955, FORST et coll. - 53 - découvrent un principe antibiotique dans le jus de culture du *Streptomyces niveus*. Le produit, la Novobiocine, est un antibiotique isolé et purifié par KACZKA et coll. (1955) - 54 -. La même équipe s'attaque (1956) - 55 - au problème de la détermination structurale. NOYAS et coll. (1956) - 56 - définissent l'activité antibiotique de la drogue. Le produit donne d'excellents résultats cliniques dans les staphylococcies, particulièrement

celles dues à des staphylocoques résistant aux antibiotiques alors usuels. HINJMAN, CARON et HOEKSEMA précisent (1957) - 57 - la structure de la Novobiocine qui est une amino 3 coumarine. Malheureusement cet antibiotique perd peu à peu beaucoup de son intérêt thérapeutique, les souches microbiennes résistant à son action se développant avec rapidité. Les chercheurs s'orientent alors vers des produits hémi-synthétiques dans l'espoir de redresser ce fâcheux résultat. WALTON et FOLKERS (1957) - 58 - synthétisent des esters de la Novobiocine comme la Tri-acétylnovobiocine, très active in vitro et in vivo sur l'infection expérimentale de la souris.

DEL CAMPO et FAZZI (1958) - 59 - testent le pouvoir antimicrobien de 29 molécules rattachées au noyau des amino hydroxy 3 coumarines. La même année, RODIGHIERO et ANTONELLO - 60 - partant de l' amino 3 dihydroxy 4,7 méthyl 8 coumarine, noyau de la Novobiocine, synthétisent des dérivés ortho, meta et para méthoxy benzolés. Ils arrivent à des produits actifs à la concentration minimale inhibitrice de 12 µg par ml sur *Staphylococcus aureus*. HOEKSINA et CARON (1960) - 61 - recherchent des composés de dégradation de la Novobiocine qui seraient encore actifs. OKUMURA, ASHINO et OKUDA (1961) - 62 - conduisent des recherches parallèles. Mais tous ces efforts, y compris ceux de KRISHNA, MOHAN RAO et coll. (1964) - 63 - ne conduisent pas à des activités pharmacologiques suffisantes pour égaler le pouvoir thérapeutique qu'avait montré la Novobiocine au début de son emploi.

Le bilan des recherches sur l'activité bactéricide dans la série ne serait pas complet sans la mention des efforts plus isolés de chercheurs conduisant des essais sur le pouvoir tuberculostatique des coumarines. BUSTINZA et LOPEZ (1946) - 64 - montrent l'activité de la quercétine in vitro sur *Mycobacterium tuberculosis*. BLANK et SUTER (1948) - 65 - ne retrouvent pas ces résultats avec des anthocyanes et des flavones naturelles (quercétine, rutine, rhamnétine).

Selon ORMANCEY, POTER et coll., le callophyllolide, pyranocoumarine extraite de *Calophyllum miophyllum*, aurait une faible activité tuberculostatique (1951) - 66 -. BERSCH et DOPE (1955) - 67 - fixent à 1×10^{-5} la concentration minimale inhibitrice de deux furanocoumarines (pimpinelline et isopimpinelline) comme tuberculostatique in vitro. La xanthotoxine et le psoralène sont deux autres furanocoumarines douées de la même activité comme le démontrent RODIGHIERO, PERISSINOTTO et CAPORALE (1956) - 68 -.

Ces activités sont nettement inférieures à celles décrites avec les tuberculostatiques d'efficacité reconnue.

- Nous citerons un seul travail sur l'activité antifongique des coumarines : celui de CHAKRABORTY, DAS GUPTA et BOSE (1957) - 69 - : sur les coumarines naturelles, les auteurs trouvent le psoralène, la sescline et la xanthylétine actives contre *Aspergillus niger* et *Curvularia lunata* à la concentration minimale de 2×10^{-4} molaire. Ce travail ne semble pas avoir eu d'écho à ce jour.

- CUTTINY, DREISBACH et coll. (1958) - 70 - essaient l'action de quelques structures chimiques de la série contre des affections virales expérimentales de la souris. L'hydroxy 7 styryl 2 méthyl chalcone est un peu active contre le virus de l'ectromélie. La naringine, flavone naturelle, semble efficace par voie orale contre cette affection. La quercétine, injectée par voie intra-cérébrale, paraît un peu active contre le virus de la rage, mais elle est inactive contre celui de l'influenza.

En résumé, les seuls agents chimiothérapeutiques possibles semblent bien se situer actuellement parmi les dérivés des amino 3 coumarines bactéricides potentiels.

C - AGENTS ANTIPARASITAIRES

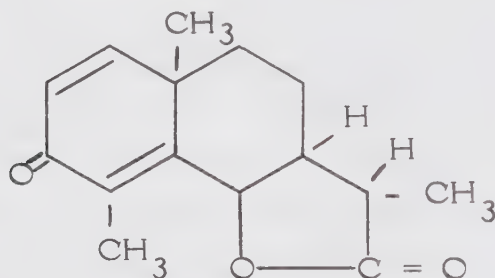
- SPALDING et coll. (1950) - 71 - recherchent le pouvoir anti-malarique des amino 4 coumarines. La (4' hydroxy 3' diéthyl amino méthyl anilino) 4 coumarine, analogue chimique de la camoquine, structure quinolinique exploitée, n'est pas active contre *Plasmodium gallinaceum* in vivo.
- Il existe une bibliographie plus importante sur l'activité des coumarines contre les helminthiases. La première référence semble remonter à 1937, date à laquelle MAHAL - 72 - essaie in vitro sur *Ascaris lumbricoïdes* et *Tœnia serrata*, l'hydroxy 7 flavone et la méthyl 4 hydroxy 7 coumarine, sans succès. En 1948 - 73 - BALDWIN signale que les structures lactoniques du type coumarinique semblent actives contre les nématodes. Ce sont surtout les équipes japonaises qui prennent le relais. ITO et coll. précisent (1950) - 20 - (1951) - 21 - (loc.cit.) que la coumarine, la 2 thiocoumarine, la méthyl 4 coumarine sont efficaces contre les nématodes in vitro. Les chromones correspondantes sont inactives. La méthylation du noyau coumarinique augmente l'activité. La Méthyl 7 coumarine tue *Ascaris suella* en 20 minutes à la concentration de 0,5 o/oo (poids/volume) in vitro $\angle$ NAKABAYASHI (1953) - 23 - (loc.cit.)_7.

Sur les thiocoumariniques, l'hydrogénation de la double liaison 3 - 4 diminue l'efficacité des dérivés (1953) - 24 - (loc.cit.). Il en est de même pour les coumarines correspondantes (1954) - 27 - (loc.cit.). Les mêmes auteurs, précisant plus encore les relations structure/activité, indiquent que la charge alkyl en 3

diminue l'activité quand la longueur de la chaîne latérale augmente, aussi bien dans les coumarines (1954) - 28 - (loc.cit.), que dans les thiocoumarines (1954) - 30 - (loc.cit.).

L'hydrogénation du noyau coumarinique diminue l'activité anthelminthique. Les auteurs font un rapprochement avec la santonine, lactone sesquiterpénique, principe actif d'*Artemisia maritima*.

[NAKABAYASHI (1954) - 29 - (loc.cit.)]_7.



ISHIFUKU et coll. trouvent un faible pouvoir ascaricide in vitro à l'ombelliférone, à son dérivé méthylé en 4, ainsi qu'à l'esculétine (1953) - 74 -.

En résumé, ces recherches localisent parmi les méthylcoumarines les corps les plus efficaces, mais ne semblent pas devoir conduire à des médicaments vraiment actifs contre les helminthiases humaines.

D - SYSTEME NERVEUX CENTRAL

De nombreuses activités pharmacologiques ont été explorées, en général dans le sens des effets sédatifs : pouvoir analgésique, anti-convulsivant, hypnotique ; mais aussi dans un sens diamétralement opposé : effet stimulant central.

- Analgésiques :

Les résultats sont ici particulièrement discordants. ITO, KITAGAWA et coll. (1953) - 25 - (loc.cit.) décrivent une faible activité expérimentale des coumarine 3 carboxylates sur la souris. Il n'existe aucune marge entre dose active et dose toxique. KUBOVIC, PRAZIC et ATANACKOVIC annoncent alors la découverte d'une puissante activité analgésique de la vitamine K sur l'animal (1955) - 75 -. Les auteurs yougoslaves retrouvent le même effet avec le dicoumarol à dose infime : jusqu'à 0,025 µg par kg de poids vif [STERN, DE ZELIC et KOSAK (1957) - 76 -].

CHEMNITIUS et HOFMANN, la même année - 77 - étendent ces résultats à toute une série de 1-4 naphtoquinones. Sommes-nous en présence d'une nouvelle classe d'analgésiques majeurs (morphiniques) eu égard aux doses actives avancées ? ADAMI et coll. (1959) - 78 - ne retrouvent pas les résultats décrits par STERN. Utilisant le cobaye, le rat et le lapin, et divers stimuli algiques (chaleur, électricité, irritation chimique), JONGE et NAUTA (1960) - 79 - concluent à l'absence d'effet analgésique de l'hydroxy 4 coumarine entre 0,01 µg et 10 mg/kg. Dans sa thèse, VAN ZANTEM (1960) - 80 - confirme ce point de vue aussi bien avec l'hydroxy 4 coumarine qu'avec la vitamine K 1.

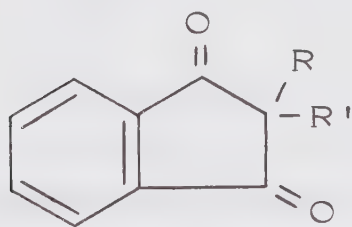
GERMANE (1961) - 81 - cependant retrouve sur l' amino 2 phényl 2 indane dione 1,3 une activité analgésique sur la souris. Nous-mêmes, avec ODIEVRE et CACHET (1961) - 82 - n'avons pas retrouvé cet effet sur la phényl indane dione.

L'effet analgésique semble donc très controversé dans la série.

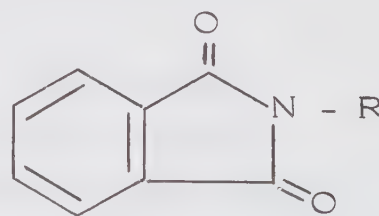
- Anticonvulsivants :

GERMANE (1961) - 83 - poursuivant l'étude des amino indane diones, assure que les dérivés amino alkyl de l' amino 2 phényl 2 indane dione 1,3 protègent la souris contre les effets convulsivants du pentaméthylène tétrazole et de l'électrochoc.

AEBI et coll. (1963) - 84 - font un rapprochement entre le radical phtalimide du thalidomide, dépresseur du système nerveux central, et les dérivés de l'indane dione du type 2,2 dialkyl.



(1)



(2)

Le corps (1) où $R = R' = C_2H_5$, serait un anticonvulsivant efficace.

- Hypnotiques :

ITO et KITAGAWA trouvent de faibles hypnotiques parmi les alpha et gamma pyrones possédant un radical carboxyl en 3. Ces produits bloquent le système cytochrome - cytochrome oxydase comme les barbituriques hypnotiques ou anesthésiques généraux. Les corps les plus efficaces de la série étudiée sont finalement l'acide coumarine 3 carboxylique et son dérivé diéthylamide. Ce dernier possède 50 % de l'activité du barbital (1951) - 22 - (1953) - 26 - (1956) - 31 et 33 - (loc.cit.). BOSE indique en 1958 - 7 - (loc.cit.) que l'angélicine, furano coumarine naturelle, induit la narcose chez le poisson. GERMANE complète la phy-sionomie des corps dérivés de l'amino 2 phényl 2 indane en précisant (1961) - 85 - que le dérivé éthylamino 2 est aussi hypnotique. Ces diverses recherches ne semblent pas avoir eu de sanctions thérapeutiques à ce jour.

- Régulation thermique :

Certains dérivés coumariniques diminuent la température rectale du rat. Il s'agit essentiellement de la thiocoumarine, des dérivés carboxyliques 3 de la coumarine, mais aussi des chromones, telle l'amino 6 chromone. $\angle$ KITAGAWA (1956) - 33 - (1957) - 35 - (1960) - 36 - (loc.cit.) $\angle$ 7. Les produits qui sont des hypnotiques aux dires de ces auteurs, bloquent les mécanismes oxydatifs cytochromes - cytochromes oxydases, ce qui les apparenterait aux barbituriques, en accord avec les travaux de MICHAELIS (1941) - 86 -. Dans le même temps cependant, certains auteurs reconnaissent au dicoumarol un effet calorigénique important, rappelant

celui du dinitrophénol [WALTON et coll. - 87 -]. SODERBERG et WACHTMEISTER (1956) - 88 - montrent que tous les coumariniques et dérivés voisins, anticoagulants, augmentent la consommation d'oxygène des tissus par découplage des phosphorylations oxydatives. L'effet hypoprothrombinémiant de ces drogues ne semble pas en cause, l'administration de vitamine K 1 ne modifiant pas les résultats. Au total, une certaine discordance se fait jour. Certains groupements chimiques sont-ils capables d'orienter vraiment vers l'hyperthermie ou l'hypothermie la réaction de l'animal ? L'hyperthermie est-elle un phénomène central ou seulement métabolique cellulaire ? Les hypothermisants sont-ils des antipyrétiques en puissance ? Les sujets de développement ne semblent pas manquer dans ce domaine.

- Sédatifs et stimulants centraux :

Là encore se recrutent dans la série des corps d'activité divergente. Dès 1949, KREITMAR - 89 - insiste sur l'effet sédatif de la coumarine chez la souris avec une marge thérapeutique étroite. BOSE confirme ces résultats (1958) - 7 - (loc.cit.). L'équipe de ITO et KITAGAWA ajoute à l'effet analgésique et hypnotique des structures précédemment décrites, un pouvoir sédatif, maximum pour la coumarine 3 carboxylate diéthylamide. Les 2 thiocoumarines et la méthyl 4 coumarine sont aussi actives, l'hydroxylation du noyau comme dans la méthyl 4 ombelliférone supprimant cet effet. [ITO, KITAGAWA et ISHÛ (1953) - 26 - (1956) - 32 - 34 - (loc.cit.)].

MOFFETT, étudiant des analogues azotés du psoralène, furano coumarine, découvre dans les oxazolocoumarines un léger effet dé-
 presseur du système nerveux central (1962) - 90 -. Les dérivés
 pyridinés en 3 et 4 des coumarines ont aussi un effet dépresseur,
 selon le même auteur (1964) - 91 -.

Selon LESPAGNOL (1964) - 92 -, la coumarine substituée en 3
 par le radical : $\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} - \text{NH}_2$ aurait un effet tranquillisant sur

la souris. Cette substitution d'une fonction amide en 3 semble bien
 favorable.

Au contraire, selon DA, RE, VERLICCHI, SETNIKAR et MUR-
 MANN, les dérivés N substitués des méthoxy 7 amino 8 méthyl
 chromones et flavones sont de puissants stimulants centraux, antidotes
 du sommeil barbiturique sur la souris, et convulsivants à forte dose
 (1959) - 93 - (1961) - 94 -. Parallèlement, GUPTA, SHARINA
 et ARORA montrent (1961) - 95 - que les bases de MANNICH pré-
 parées à partir de l'ombelliférone et la méthyl 4 ombelliférone sont
 de puissants excitants centraux et respiratoires. Ces dérivés seraient
 plus actifs que les structures chromoniques et flavoniques correspon-
 dantes. Dans le même ordre d'idées, KUMAR et JOSHI (1965) - 96 -
 recherchent des stimulants potentiels dans les bases de MANNICH
 des hydroxy 7 éthyl 6 méthyl 4 coumarines.

Au total, la chaîne azotée en 8 dans les chromones, les flavones et
 les coumarines semblent bien déclencher des phénomènes d'excitation
 centrale et de stimulation du centre respiratoire.

En addition, VIDAL, BERETERVIDE et MONTI (1963) - 97 - indiquent dans leur travail qu'un effet identique est obtenu avec l'ester tropique de l'acide chromone 2 carboxylique.

Cette étude bibliographique montre que les coumarines ont des actions centrales polymorphes, parfois controversées (analgésique) parfois opposées (hypo et hyperthermisante, sédative et excitante centrale).

E - SYSTEME RESPIRATOIRE

Un travail isolé [BLUMBERG, DAYTON et GARDON (1957) - 98] apporte la preuve d'un effet bronchodilatateur, vérifié sur le cobaye, de l'anticoagulant warfarine sodée. Il s'agit d'une hydroxy 4 coumarine. L'apport essentiel reste cependant la découverte de la stimulation respiratoire déclenchée chez diverses espèces par les analeptiques centraux décrits au paragraphe précédent. Ces coumarines et chromones substituées en 8 généralement par une chaîne azotée (bases de MANNICH) sont des analeptiques respiratoires capables de ramener à la normale la respiration du lapin endormi et morphiné. La correction de cette dépression expérimentale touche à la fois le rythme et l'amplitude. Elle est de longue durée. Les auteurs obtiennent ce résultat avec des doses assez éloignées des doses convulsivantes [DA, RE et coll. - 93 - (loc.cit.)] [GUPTA et coll. - 95 - (loc.cit.)]. Récemment, BOSCHETTI, MOLHO, AKNIN, GRAND et FONTAINE ont étendu ces résultats à d'autres bases de MANNICH (1966) - 99 -.

En 1964, JAMWAL - 100 - attribue à l'osthol, une méthoxy 7 isopentényl 8 coumarine naturelle, un pouvoir analeptique respiratoire important retrouvé sur le chien et le lapin. Notons que la substitution en 8 n'a pas cette fois un caractère basique.

En conclusion, la stimulation respiratoire observée est d'origine bulbair et ne peut être dissociée, dans tous ces dérivés, de l'excitation centrale. Tous ces produits inhibent la dépression barbiturique. Finalement, il n'y a pas de marge thérapeutique suffisante chez l'homme pour obtenir actuellement dans la série, un analeptique respiratoire dénué d'effets centraux gênants.

F - MUSCULATURE STRIEE

ARORA, SESHADRI et KRISHNASWAMY (1960) - 101 - étudient l'effet antivératrinique de 27 composés sur le muscle Sartorius de la grenouille. L'alcaloïde déclenche des perturbations de la phase de décontraction, conduisant à la rigidité musculaire. Les phényl 3 coumarines et la méthoxy 7 phényl 4 coumarine semblent aussi efficaces que la quinine dans la protection contre la vératrine. Les auteurs évoquent la possibilité d'emploi de ces coumarines dans le traitement de la myotonie.

BOSE (1958) - 7 - (loc.cit.) indique que la coumarine elle-même a une activité curarimimétique sur l'animal.

Ces travaux n'ont pas trouvé d'autres échos. Il serait sans doute intéressant de rechercher l'effet de diverses coumarines sur la plaque myoneurale et sur les chronaxies des muscles striés.

G - PEAU

Depuis très longtemps, les Indiens utilisaient les graines de *Psoralea corylifolia* dans le traitement des leucodermies, lorsque JOIS, MAN-JUNATH et RAO publient la première observation d'une photosensibilisation de la peau avec ce médicament populaire (1933) - 102 -.

En 1938, KUSKE - 103 - écrit que les furano coumarines sont responsables des photosensibilisations déclenchées par certaines plantes. Deux autres Egyptiens, FAHMY et ABU-SHADY extraient trois principes cristallisés des graines d'*Ammi majus*, utilisées elles aussi empiriquement jusque là pour la pigmentation des leucodermies. Dans le même temps, ces auteurs identifient ces trois corps à la xanthotoxine, à l'impératorine et au bergaptène, trois furano coumarines (1947) - 104 - 105 -.

LERNER et FITZPATRICK (1950) - 106 - (1953) - 107 - 108 - s'attachent à définir le mode d'action des furano coumarines sur la pigmentation de la peau sous l'influence de la lumière. Les furano coumarines doivent intervenir dans la formation de la mélanine. Les auteurs démontrent cependant que le psoralène n'influence pas la tyrosinase, enzyme catalysant le passage de la tyrosine à la dihydroxyphénylalanine (Dopa).

KORTING, FRIEDERICH et ADAMS confirment dans le même temps cette conclusion (1953) - 109 -.

Envisageant l'étude de nouveaux dérivés synthétiques actifs, MUSAJO, RODIGHIERO et CAPORALE (1953) - 110 - définissent les relations structure/activité parmi les corps connus. Les produits

sont appliqués par badigeonnage sur la peau de l'homme. La pigmentation est appréciée 8 jours après l'irradiation de la région traitée sous générateur de rayons ultra-violet. Le psoralène, la xanthotoxine, le bergaptène et l'angélicine, tous furano coumarines, sont actifs. L'impératorine, autre furano coumarine, fait exception. Les furanes, benzofuranes, α pyrones et coumarines n'ont aucun effet. La même équipe synthétise alors de nombreux dérivés sans réussir à s'éloigner du groupe des furano coumarines. Le corps le plus actif reste le psoralène. Les groupes phénoliques libres inactivent la molécule, les méthyl esters phénoliques reprenant quelque activité. Le greffage de chaînes plus longues alourdissant la molécule est tout à fait néfaste (1953) - 110 -. Il semble déjà difficile de s'éloigner du schéma naturel ; ce que précise une série de monographies : CAPORALE (1958) - 111 - BOSE (1958) - 7 - (loc.cit.), anonyme (1958) - 112 -. MUSAJO et son équipe concluent (1958) - 113 - que toute addition à la molécule du psoralène diminue son efficacité photosensibilisatrice. PATHAK et FITZPATRICK, après étude de 17 molécules, arrivent aux mêmes conclusions (1959) - 114 -.

Les auteurs s'attachent alors à améliorer nos connaissances sur le mécanisme de cette action singulière. FOWLKS (1959) - 115 - émet l'hypothèse que le photosensibilisateur, complexé aux protéines, absorbe l'énergie lumineuse qui sert ensuite à divers phénomènes oxydatifs. JUDIS (1960) - 116 - constate que la xanthotoxine peut favoriser la transformation de Dopa en mélanine, sous rayonnement énergétique suffisant, aux environs de 366 m μ . PATHAK et FELLMAN (1960) - 117 - pensent que la photosensibilisation par les furano coumarines s'expliquerait par la capacité de certaines molécules d'absorber une certaine énergie lumineuse. Il y a parallélisme

comme cela semble se dégager de l'étude de 37 substances, entre le pouvoir "noircissant" de la peau par les furano coumarines et l'absorption lumineuse de leurs solutions aqueuses vers 340, 380 mμ, avec ré-émission d'une fluorescence vers 420, 460 mμ. Les substances qui n'ont pas ce caractère ne sont pas photosensibilisantes [PATHAK, FELLMAN et KAUFMAN (1960) - 118 -]. Les auteurs cherchent le point d'impact de ce transfert d'énergie lumineuse parmi les diastases concernées par la synthèse de la mélanine. Pour MUSAJO et RODIGHIERO (1961) - 119 - le flavine mono nucléotide réagit seulement avec les furano coumarines photosensibilisantes. Le cycle furane du photosensibilisateur semble atteint. PATHAK et FOWLKS (1961) - 120 - étudient l'activité de la déshydrogénase succinique de la peau du cobaye avant et après irradiation aux U.V., en présence ou en absence de psoralène. 24 heures après passage sous le générateur d'ultra-violets, les fragments de peau d'animaux traités au psoralène montrent une inhibition totale du système enzymatique étudié.

Nous pouvons conclure que la pigmentation de la peau par les furano coumarines reste l'apanage de quelques drogues naturelles, que ces drogues semblent jouer un rôle en modifiant, par transfert de l'énergie lumineuse reçue, la synthèse ou le métabolisme de la mélanine. Il n'y a pas encore d'explication complète de ce phénomène.

H - SPHERE SEXUELLE

Deux domaines ont été inégalement explorés par les auteurs : la contraception et surtout le pouvoir œstrogénique dans la série.

- Anticonceptionnels :

Selon MARTIN et BEILER, l'Hespéridine phosphorylée, donnée à des rattes à faible dose (20 mg/kg par voie I.P.) empêche la fécondation dans 80 % des cas. Les auteurs avancent l'explication d'une neutralisation de la hyaluronidase spermatique (1952) - 121 -.

SIEVE (1953) - 122 - utilisant 300 couples de souris, obtient un effet anticonceptionnel subtotal à la dose de 300 mg per os, chez le mâle et la femelle. Contrairement à ces résultats, CHANG et PINCUS ne retrouvent pas d'effet sur le lapin (1953) - 123 -.

Dans le même temps, WESTING (1953) - 124 - essaie cette flavonone chez 17 couples. Les résultats cliniques sont négatifs.

En résumé, le problème ne semble pas définitivement tranché, encore que le poids des conclusions de l'équipe PINCUS fasse pencher défavorablement la balance.

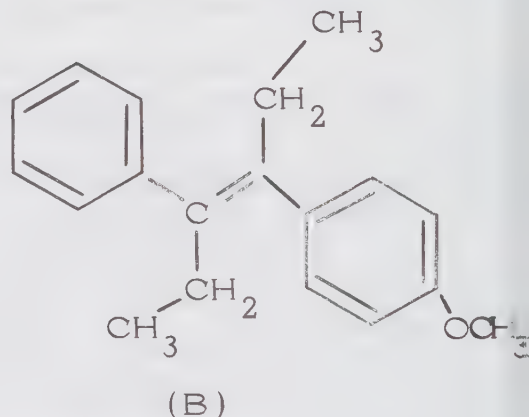
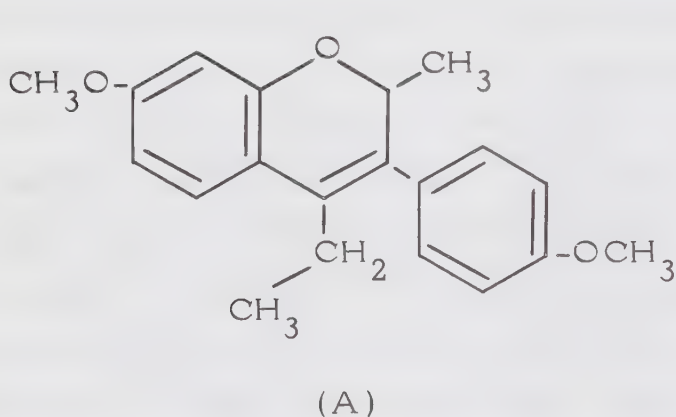
- Œstrogènes :

On trouvera dans la substantielle revue de SOINE (1964) - 19 - (loc.cit.), une remarquable mise au point sur la question.

Dès 1946, MENTZER, GLEY, MOLHO et BILLET - 125 - recherchent l'activité œstrogène de diverses structures parmi les alkyl 4 coumarines. Le corps le plus actif est la dihydroxy 7,4 norpropyl 4 coumarine. Le radical le plus favorable en 4 est le norpropyl. Les auteurs pensent qu'il peut exister une relation structurale entre certains dérivés des coumarines et ceux du diéthylstilbœstrol, ce qui leur permet de prévoir sur des bases théoriques l'activité œstrogène dans la série, résultats qui seront confirmés ultérieurement. Il existe un parallélisme entre la découverte des effets anticoagulants des coumarines naturelles et celle de leur activité œstrogène. Dans les deux cas, l'histoire remonte à des observations initiales de vétérinaires constatant des perturbations biologiques chez les animaux domestiques ingérant certaines plantes toxiques. BENNETTS, UNDERWOOD et SHIER (1946) - 126 -, vétérinaires australiens, observent que l'ingestion de *Trifolium subterraneum* perturbe la gestation chez le mouton. Il existe donc des plantes "stérilisantes". CURNOW, ROBINSON et UNDERWOOD confirment, en conduisant des tests d'ALLEN DOISY sur la souris, que *Trifolium subterraneum* a un effet œstrogène expliquant les avortements vus sur les animaux domestiques (1948) - 127 -.

BRADBURY et WHITE (1951) - 128 - isolent de la plante incriminée deux isoflavones : la génistéine et la formononétine. Ces corps sont œstrogènes à la dose de 1 mg par souris. Il s'agit donc des responsables de la "maladie" conférée par le trèfle. BIGGERS et CURNOW (1954) - 129 - confirment ces conclusions. BRADBURY et WHITE donnent la liste des plantes déclenchant l'œstrus des mammifères ainsi que les composés incriminés. Il s'agit essentiellement des coumarines et des isoflavones.

Les isoflavones doivent avoir une double liaison entre les sommets 2 et 3, un hydroxyle en 5. La tautomérisation en 4 doit être possible. La coplanéité de la molécule doit être respectée, laissant l'édifice moléculaire dans un même plan, comme c'est le cas du stilbestrol (1953) - 130 - (1954) - 131 -. Les recherches se développent avec LAWSON (1954) - 132 - qui montre que l'éthyl 4 diméthoxy 7, 4' méthyl 2 isoflav 3 ène (A) a le squelette carboné du stilbestrol diméthyléther (B). Il a la même activité œstrogène.

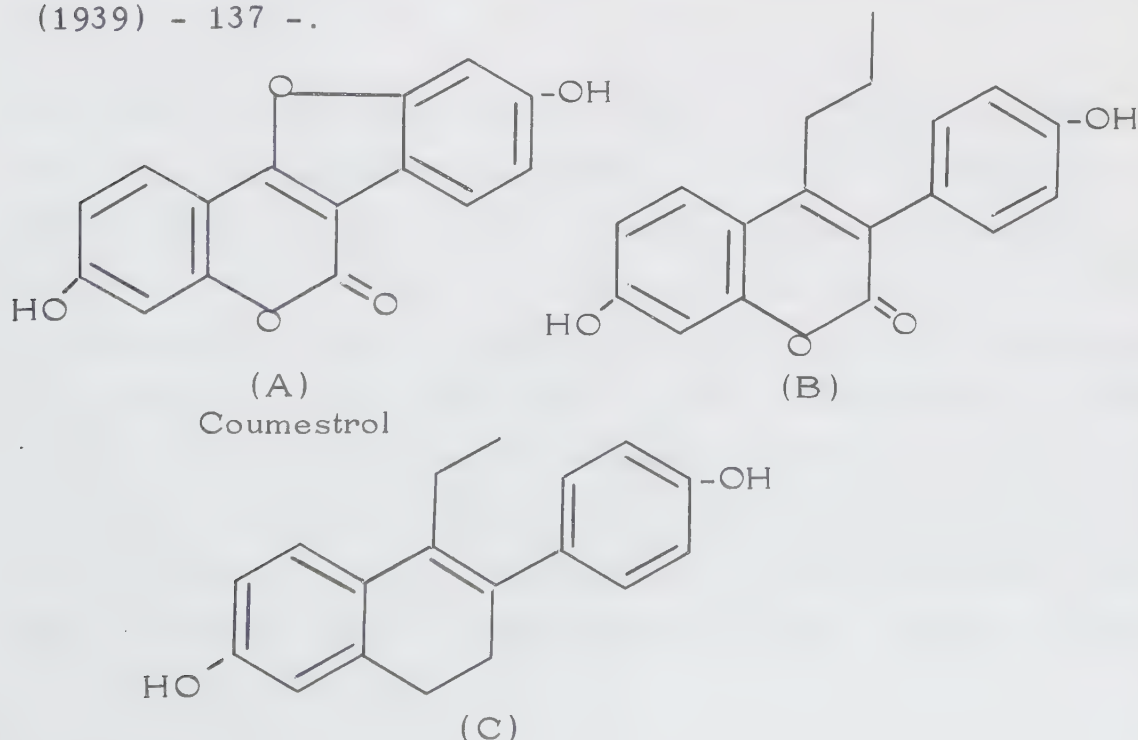


Les isoflavènes semblent plus efficaces que les isoflavones. CHENG YODER et coll. (1955) - 133 - vérifient l'activité de la génistéine et de la daidzéine ou dihydroxy 7, 4' isoflavone sur l'utérus de la souris. La daidzéine, plus active que la génistéine, est cependant très inférieure au stilbestrol. BOUNDS et POPE extraient de Pueraria mirifica, une isoflavène œstrogène, le mirœstrol (1960) - 134 - dont TAYLOR, HODGKIN et ROLLET précisent la structure par détermination cristallographique aux rayons X (1960) - 135 -.

Les recherches sur les coumarines se développent parallèlement. En 1953, MOLHO - 1 - (loc.cit.) fait le point des connaissances et essaie de dissocier les effets anticoagulants et œstrogènes. Dans les coumarines, il existe une faible activité œstrogène lorsque :

- un noyau phényl existe en 3
- un noyau hydroxyle figure en 7
- un radical alkyl, par exemple norpropyl, remplace en 4 l'hydroxyle des coumarines anticoagulantes.

A ce moment, BICKOFF et coll. (1958) - 136 - isolent de Ladino clover, un œstrogène distinct des drogues décrites jusqu'ici. Il s'agit du coumestrol, un dérivé des phényl 3 coumarines, 30 fois plus efficace que la génistéine selon le test d'ALLEN DOISY conduit sur la souris. Ce produit (A) est aussi actif que celui (B) décrit par MENTZER et coll. comme ayant un puissant effet œstrogène du fait de ses relations structurales avec un dérivé du stilbestrol (C), précédemment synthétisé par DODDS et coll. (1939) - 137 -.



EMERSON et BICKOFF confirment la structure du coumestrol en effectuant sa synthèse (1958) - 138 -. Deux travaux importants font alors le point du développement des recherches parmi les isoflavones, isoflavènes, coumarines et phénylcoumarines douées du pouvoir de déclencher l'œstrus : BIGGERS (1958) - 139 - MICHELI, BOOTH et coll. (1962) - 140 -.

En résumé, parmi les isoflavones, il faut retenir la daidzéine, la formononétine et la génistéine, par ordre d'activité décroissante. Parmi les isoflavènes, le mirœstrol semble plus efficace que les isoflavones. Dans les coumarines, de faibles activités sont retrouvées dans les norpropyl 4 coumarines, et le coumestrol semble le dérivé isolé le plus puissant. Les meilleurs de ces dérivés approchent l'effet du diéthylstilbœstrol mais restent assez loin du pouvoir œstrogène de l'œstradiol.

I - CYTOGENETIQUE

Nous groupons sous ce vocable les tentatives et résultats concernant les effet inhibiteurs de la division cellulaire, anticancéreux et radio-protecteurs éventuels, de certains dérivés coumariniques.

DAUER et CRON (1952) - 141 - recherchent les effets de protection de diverses drogues contre des doses mortelles de rayons X sur la souris. Après essai de la quercétine (flavone), de l'hespéridine méthyl chalcone et du flavonate de calcium, les auteurs concluent négativement, alors que précédemment, CLARK, UNCAPHER et JORDAN (1948) - 142 - utilisant de gros cobayes traités avec des flavonoïdes en solution dans l'eau de boisson à 0,2 % avaient observé une grande diminution de mortalité pour les traités, dans un délai totalement léthal pour les témoins (13 jours après l'irradiation).

Dans ce dernier cas, l'absence de pétéchies, de purpura généralisé et de symptômes hémorragiques chez les cobayes traités suggère un effet prophylactique contre la fragilisation capillaire plutôt qu'un effet de radioprotection.

Dans sa revue générale, BOSE (1958) - 7 - (loc.cit.) indique que de nombreuses coumarines naturelles ont un effet accélérateur ou inhibiteur de la croissance des cellules végétales. L'esculétine et l'ombelliférone sont inhibitrice. Déjà en 1954, BUU-HOI et ECERT recherchent des effets carcinolytiques parmi les aryl 3 et les diaryl 3,4 coumarines hydroxylées (1954) - 143 -. QUERCIOLI recherche aussi dans la même direction, utilisant les effets de la coumarine sur les cellules isolées d'*Allium cepa* en culture, in vitro. La coumarine semble inhiber la division cellulaire au stade de la prophase (1954) - 144 - (1955) - 145 -. RODIGHIERO et coll. (1961) - 146 -

poursuivent ces essais in vitro. HANO, KANI et HAGIHARA (1958 - 147 - étudient l'effet cancérostatique in vitro de 60 flavonoïdes sur la multiplication des cellules d'hépatome ascitique du rat. La d-catéchine (dérivé du chromène) semble efficace, mais ces essais in vitro sont sujets à caution. Passant sur l'animal, LACOUR, OBERLING et GUERIN (1957) - 148 - constatent que l'éthyl dicoumarol freine le développement des métastases chez la souris porteuse de l'épithélioma T 8. Les auteurs relient cet effet protecteur à l'anticoagulation conférée par la drogue. Les cellules cancéreuses disséminant les métastases circulent dans le sang, protégées par une coque de fibrine qui les enrobe. Les phénomènes phagocytaires de défense ne peuvent alors jouer à plein.

Plus récemment, VERMEL et ZSETHIN (1964) - 149 - recherchent sur le même type de cancer, l'activité des furano coumarines voisines du psoralène. Il semble exister une action synergique avec un radiomimétique d'efficacité reconnue, le thiotepa.

Existe-t-il aujourd'hui un espoir de voir aboutir concrètement ces efforts en clinique ? La porte ne semble pas fermée, comme en témoignent les résultats de MICHAELS (1964) - 150 -. L'auteur étudie l'incidence des cancers chez les malades traités aux antivitaminés K pour des causes diverses : artériopathies et infarctus cardiaques. Il compare le pourcentage de morbidité par métastases obtenu après une observation prolongée dans une population de malades traités aux anticoagulants coumariniques, à celui obtenu dans une population identique non traitée : il a la surprise de constater chez les traités, une très grande diminution de la fréquence des néoplasmes par rapport à la fréquence attendue. L'auteur rapproche les résultats de ceux de LACOUR et OBERLING sur l'animal - 148 - (loc. cit.).

J - EXCRETION

Les résultats sont essentiellement étoffés dans le domaine rénal et concernent des diurétiques et des uricosuriques potentiels.

- En 1938, OKUI - 151 - reconnaît à la fraxine, glucoside dont l'aglycone est une coumarine trihydroxylée, un pouvoir diurétique sur le lapin, la réponse au produit durant plusieurs heures.

BOSE (1958) - 7 - (loc.cit.) indique que le produit est uricosurique et diurétique, sur le même animal. Son activité le place au dessus de l'atophan, drogue plus ancienne qui a eu un large emploi clinique.

Lors des essais cliniques initiaux de la phényl indane dione, GUEGUEN avait déjà remarqué (1948) - 152 - un fort pouvoir diurétique de cet anticoagulant. Il s'écoule alors plusieurs années avant que MEYER (1963) - 153 - prenne un brevet pour une substance diurétique qui est une méthyl 3, hydroxy 4, chloro 7 coumarine possédant une substitution sulfonamide en 6. Le produit est revendiqué comme natriurétique à la dose de 2,5 mg/kg per os sur l'animal. Dans le même temps, confirmant le renouveau de l'intérêt des chercheurs dans ce domaine, CASCIO et PALAZZOADRIANO (1964) - 154 - 155 - montrent que l'aldéhyde glyoxyl 3 coumarinique augmente la diurèse avec élévation du sodium et du chlore excrétés, la fuite en potassium étant relativement faible. Les auteurs attribuent ces effets à un pouvoir anti-aldostéronique de la drogue. Tout récemment, SELLERI, ORZALESI, CALDINI et SPANO (1966) - 156 - étudient plus de 20 structures coumariniques porteuses de radicaux carboxyliques

multiples. Ces acides du type coumarine 3 carboxylate d'éthyle sont des diurétiques dont les meilleurs doublent la diurèse chez l'animal, augmentant la natriurèse de deux à quatre fois.

- Cet effet diurétique s'accompagne d'une décharge uricosurique vérifiée en clinique. Dès 1955, SOUGIN-MIBASHAN et HORWITZ - 157 - publient la première observation sur les effets uricosuriques et antigoutteux de l'éthyl bis-coumacétate, anticoagulant coumarinique largement employé. PASERO et MARINI (1958) - 158 - comparent les divers anticoagulants à ce point de vue. Il n'y a pas de relation entre l'effet uricosurique et l'importance de l'hypoprothrombinémie obtenue. L'éthyl bis-coumacétate paraît plus efficace que la phényl indane dione et le marcoumar. Régulièrement, des publications, toujours cliniques, confirment cette activité insolite : HANSEN et HOLTEN utilisent une dose de charge de 500 mg chez 40 patients, abaissant l'uricémie de plus de 20 mg par litre (1958) - 159 -. THOMPSON et coll. (1959) - 160 - précisent que l'éthyl bis-coumacétate est le meilleur anticoagulant à ce point de vue, son efficacité restant cependant en retrait de celle du probénicide. Selon CHRISTENSEN (1964) - 161 -, sous l'influence du dicoumarol, la clearance rénale de l'acide urique double chez l'homme, 24 heures après une dose de charge. Des essais sont conduits par PASERO (1960) - 162 - en vue de dissocier les activités anticoagulantes et uricosuriques - problème permanent dans cette série chimique -. L'auteur essaie avec succès chez l'homme des dérivés de l'indane dione portant un atome de chlore en 5, dans l'espoir de supprimer l'activité anticoagulante. Comme nous le verrons plus loin, il reste cependant une réponse hypoprothrombinémiante capable d'interdire une telle médication au long cours chez les goutteux.

K - MUSCULATURE LISSE

Certains hétérocycles de la série ont un pouvoir relaxant sur les fibres lisses contractées par divers poisons musculotropes (chlorure de baryum) ou neurotropes (acétylcholine). Des coumarines, chromones, flavones et chalcones ont retenu l'attention des chercheurs.

- BOSE rappelle (1958) - 7 - (loc.cit.) que la coumarine elle-même diminue le tonus et supprime le péristaltisme de l'intestin grêle isolé du lapin. CALL et FISCHER (1958) - 163 - (1956) - 164 - cristallisent à partir de l'huile extraite des fruits de *Lomatium suksdorfii*, une coumarine qu'ils nomment suksdorfine. Cette substance est un spasmolytique musculotrope dont l'efficacité égale celle de la papavérine sur les fibres lisses isolées. La drogue est comparée à deux furano coumarines, la columbiarine et l'impératorine. Sur l'utérus isolé de ratte, les comparaisons d'activité à la papavérine sont, dans l'ordre : papavérine 1 - suksdorfine 1 - columbiarine 1,4 - impératorine 1,6. Les mêmes auteurs isolent des racines de *Pteryxia terebinthina*, une coumarine, la ptéryxine, qui semble quatre fois plus efficace que la papavérine comme inhibiteur des mouvements propres de l'utérus de ratte isolé. Ultérieurement, WILLETTE et SOINE (1962) - 165 - précisent la structure de la suksdorfine et de la ptéryxine. Ce sont toutes deux des pyrano coumarines. PANIGRAHI (1966) - 165 bis - s'intéresse à des diéthylamino acétoxy 4 coumarines qui seraient spasmolytiques in vitro.

Dans le domaine des chromones, la méthyl 2 chromone est un spasmolytique reconnu à polarité papavérinique et tropisme vasculaire. Il en sera fait mention plus loin. La khelline $\angle$ -SAMAAN (1938) - 166 - $\angle$, dérivé diméthoxylé d'une furano 6,7 chromone, est deux fois plus efficace que la papavérine sur l'utérus isolé de la ratte (CALL et FISCHER - 163 - loc.cit.).

SCHMUTZ, HIRT, KUNZLE et EICHEN BERGER décrivent aussi (1953) - 167 - des spasmolytiques papavériniques nouveaux, chromones substituées par des radicaux basiques, parmi lesquelles la (4' pyridyl) 2 méthoxy 5 chromone semble se rapprocher de l'activité de l'étalon. Dans une étude plus générale, ARTEMENKO précise (1957) - 168 - que la destruction de l'hétérocycle des chromones diminue fortement l'effet antispasmodique sur les fibres lisses. Les corps les plus actifs selon cet auteur semblent être la chromone et le sel de sodium de l'acide chromone 2 carboxylique. Les conclusions du travail de BRADEL-GAY (1962) - 169 - sont de même nature : sur l'iléon isolé du cobaye, les dérivés les plus simples de l'éthyl 3 chromone sont les plus efficaces, encore que faiblement actifs : ils ne dépassent pas le quart de l'effet de la papavérine.

Il existe enfin des recherches actives dans le groupe des flavones et des chalcones. FORMANEK, HOLLER, JANISCH (1959) - 170 - cherchant à préciser dans ce groupe les relations entre la structure chimique et l'activité spasmolytique, arrivent à la conclusion que l'hydroxy 2 chalcone, la flavone et la trihydroxy 2, 4, 4' chalcone, égalent la papavérine dans des essais sur l'intestin isolé du rat contracté par le chlorure de baryum. Les produits sont faiblement atropiniques. Sur l'estomac de lapin isolé

et contracté par le chlorure de baryum, BORKOWSKI et SZPUNAR (1960) - 171 - montrent que la quercétine, la naringénine sont des aglycones plus spasmolytiques que les glucosides correspondants. Le rutinoside est inefficace.

DA, RE, VERLICI et SETNIKAR (1960) - 172 - décrivent successivement une méthyl 3 diéthyl 6 aminométhyl flavone, qui serait plus active que la papavérine, et la méthyl 2 flavone 8 carboxylate de méthyl, efficace dans la sphère urogénitale (1964) - 173 -.

Au total, les activités spasmolytiques sont assez largement répandues dans la série de ces hétérocycles, toujours uniquement de type papavérinique, la plupart du temps inférieure à celle de l'étalon, les structures les plus simples semblant les plus actives.

- Dans un ordre d'idées voisin, les auteurs testent l'efficacité antihistaminique de la rutine contre le choc mortel du cobaye et du lapin après injection d'histamine.

LEVITAN (1948) - 174 - trouve la rutine inefficace sur le lapin, même à 200 mg/kg par voie orale. CLARK, MAC KAY et JORDAN (1950) - 175 - trouvent exactement le contraire avec 100 mg/kg de ce flavonoïde donné par voie intra-péritonéale. Selon ces derniers, les chalcones, l'héspéridine, sont inefficaces, alors que le sel sodique de la quercétine sulfonée protège aussi le cobaye contre le choc histaminique. EWERBECK et LEGERSKI (1955) - 176 - ne retrouvent pas ces résultats positifs avec la rutine sur l'homme : cette flavone n'empêche pas l'apparition du bouton histaminique sur la peau de l'avant-bras.

PACKMAN et RUBIN (1962) - 177 - trouvent une faible activité anti-histaminique à la (diéthyl 2' amino éthoxy) 2 chalcone. Les activités anti-histaminiques semblent très controversées dans la série, et en tout cas encore plus faibles, par rapport aux étalons reconnus, que l'activité spasmolytique musculotrope.

L - SYSTEME CIRCULATOIRE

Dans le domaine cardiaque, les chercheurs ont porté leur attention sur les drogues modifiant l'automaticité de la contraction et sur celles douées d'un pouvoir dilatateur des artères coronaires. Ce dernier problème jouxte celui de l'athérome et de son cortège biologique : hypercholestérolémie par exemple. La fragilisation capillaire est une donnée voisine mais sans doute distincte de celle de l'anticoagulation : de nombreuses recherches s'y rattachent. Enfin, quelques références concernant des recherches sur les hypotenseurs compléteront le tableau actuel de nos connaissances des effets des drogues coumariniques sur le système circulatoire.

- a) VARONOS, VOUKYDES et NIKITOPOULOU (1962) - 178 - constatent que la visnadine (provismine), furano chromone extraite d'*Ammi visnaga*, augmente le taux de survie des animaux traités par des doses toxiques de digitoxine. La visnadine prévient la bradycardie et supprime l'arythmie cardiaque. Le calophyllolide, par ailleurs doué d'activité anticoagulante, serait selon ARORA, MATHUR et SETH (1962) - 179 - capable d'empêcher l'apparition de rythmes ectopiques chez le chien dont certaines branches des artères coronaires ont été liées. Le produit serait aussi efficace que la quinidine.
- b) Très tôt, les auteurs ont recherché d'autres explications que celles découlant du pouvoir hypoprothrombinémiant, pour comprendre l'efficacité clinique des coumariniques dans la prophylaxie ou le traitement des thromboses. WRIGHT, KUBIK et HAYDEN (1953) - 180 - montrent que l'éthyl bis-coumacétate favorise la

recanalisation des vaisseaux thrombosés et aide au développement de la circulation collatérale. Ces essais conduits sur le lapin porteur d'une thrombose expérimentale de l'artère fémorale, rejoignent par certaines de leurs conclusions, toute une série de travaux montrant l'effet vasodilatateur de ces produits. GILBERT et NALEFSKI (1949) - 181 - précisent que le dicoumarol, l'éthyl bis-coumacétate et l'héparine sont coronarodilatateurs ; résultat confirmé par PATEL et PATEL (1959) - 182 - et étendu à la warfarine sodée par PREZIOSI et BIANCHI (1959) - 183 -. Récemment BLAKE, WOOD, O'MOORE et NEEL (1962) - 184 - démontrent par une élégante méthode in vitro (pléthysmographie d'artère coronaire isolée du porc) l'activité de divers coronarodilatateurs. Les antivitamines K coumariniques essayées semblent aussi efficaces que l'aminophylline.

Les recherches s'étendent parallèlement sur les structures nouvelles : parmi les coumarines, les flavones et les chromones. WILLETTE (1960) - 185 - (1961) - 186 - essaie l'action de la ptérixine et de la suksdorfine, dont il a déjà été fait mention, sur le débit coronaire du lapin.

Dans l'essai du cœur isolé, ces deux pyrano coumarines sont plus vasodilatatrices que la papavérine et certaines chromones utilisées en clinique. MASSARANI (1963) - 187 - trouve dans les mêmes conditions une activité supérieure à l'étalon pour des esters de l'hydroxy 6 méthyl 4 coumarine, de l'ombelliférone et de la méthyl 4 ombelliférone ; par exemple, pour l'hydroxy acétate, l'alpha hydroxy propionate, l'alpha hydroxy butyrate. Ce dernier serait significativement coronarodilatateur in vitro

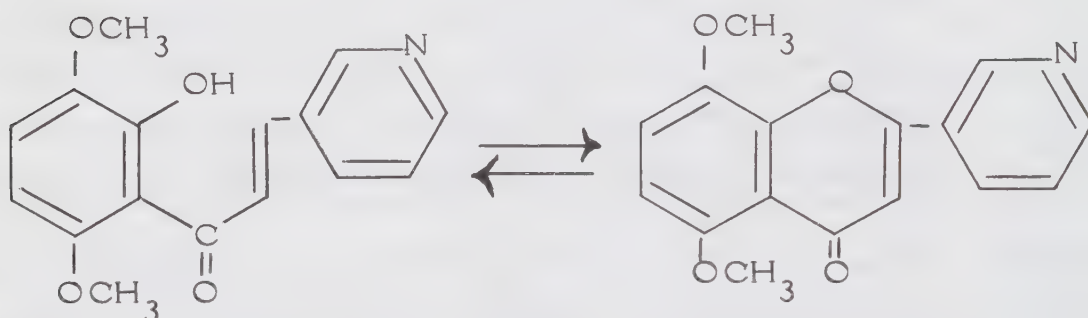
lorsqu'il est présent dans le liquide de perfusion du cœur isolé du lapin selon LANGENDORFF (1895) - 188 - à la concentration de 0,6 µg par ml. Les recherches de NITZ et PÖTZSCH (1963) - 189 - mettent en valeur une méthyl 4 coumarine substituée en 3 et 7, qui aboutit en clinique sous le nom de Carbochromène.

MATHUR, MITRA et coll. (1965) - 190 - étudient 40 nouvelles coumarines à ce propos : parmi les hydroxy coumarines, les dérivés méthoxylés retiennent l'attention des auteurs sans qu'ils puissent conclure à une grande efficacité pharmacologique.

Toute une série de recherches s'est développée à partir de la découverte de la khelline dans les extraits de fruits d'*Ammi visnaga*. SMITH, PUCCI et BYWATER (1952) - 191 - isolent du même extrait, une pyrano coumarine, la visnadine, dont l'activité coronarodilatatrice est très importante [GOMES (1953) - 192 -]. SMITH, HOSANSKI, BYWATER et VAN TAMELEN isolent encore deux pyrano coumarines supplémentaires du même extrait, la samidine et la dihydrosamidine qu'ils qualifient de puissants vasodilatateurs (1957) - 193 -. Seule la visnadine ou provismine a débouché en clinique, les effets sur l'homme semblant favorables dans le traitement de l'angine de poitrine selon MOUQUIN et MACREZ (1966) - 194 -.

Les flavones ont été étudiées par SETNIKAR qui retient (1961) - 195 - la flavone oxyacétate 7 d'éthyle, comme nettement supérieure à la papavérine après essai in vitro selon LANGENDORFF.

MORIN, ROUX et JACHIET (1964) - 196 - arrivent aux mêmes conclusions. L'activité du produit équivaldrait à 20 fois celle de la khelline. KOO (1964) - 197 - trouve une puissante efficacité coronarodilatatrice expérimentale aux β -pyridylacrylophénols qui sont en fait des chalcones, isostères de flavones elles-mêmes actives.



Dans le groupe des chromones, les recherches ne sont pas moins actives. En dehors de la méthyl 2 diméthoxy 5,9 furano 6,7 chromone, ou khelline, BAXTER, RAMAGE et TIMSON (1950 - 198 -, DA, RE (1958) - 199 - développent des recherches sur des structures voisines. BRADEL GAY (1962) - 169 - (loc.cit.) insiste sur des dérivés de l'éthyl 3 chromone moins coronarodilatateur que la papavérine. Récemment, une équipe de recherche française prend un brevet pour la même indication sur l'éthyl 2 carbéthoxy 3 chromone : BRUNEAU (1961) - 200 -.

Finalement, ces vasodilatateurs potentiels à tropisme coronaire ne semblent avoir apporté à la thérapeutique que quatre médicaments nouveaux :

- la khelline, furano chromone
- la visnadine, pyrano coumarine
- la flavone oxyacétate 7 d'éthyl, méthyl 3 flavone
- le carbochromène, dérivé d'une méthyl 4 coumarine.

Nous rapprocherons de ce groupe un dérivé des benzofuranes, la benziodarone, dont l'activité serait 100 fois supérieure à celle de la khelline selon DELTOUR, BINON, HENAU et CHARLIER (1961) - 201 -.

- c) Sur le syndrome biologique et anatomique de l'athérosclérose, les auteurs ont accumulé des travaux dont les résultats sont divergents.

Sur l'animal, DI MAGGIO (1957) - 202 - montre que la cholestérolémie du rat rendu athéromateux s'abaisse sous traitement à la quercétine. Ce flavonoïde tend à normaliser le lipidogramme perturbé de l'animal (lipides totaux et lipoprotéines sériques).

LOBOVA (1961) - 203 - déclenche un athérome vasculaire expérimental chez des poulets nourris avec un régime surchargé en cholestérol. La rutine empêcherait l'élévation du taux de cholestérol total dans le sang et dans le foie. D'autres auteurs conduisent des recherches parallèles chez l'homme. MESSINGER et POROSOWSKA (1953) - 204 - montrent que l'hespéridine phosphate a un effet protecteur chez des patients soumis au test du repas gras standard : leur turbidité sérique ne s'élève pas, la drogue semblant avoir un pouvoir clarifiant du sérum. ANNONI (1957) - 205 - précise que le sulfate double de sodium et de méthyl 4 esculétine est doué, chez les patients, d'un pouvoir hypocholestérolémiant. La baisse atteint 30 % des taux initiaux après ingestion de 250 mg de la drogue. LENZI conclut dans le même sens après traitement prolongé avec une coumarine anticoagulante, l'acénocoumarine (1959) - 206 -. FRILEUX et SAKKA, pour leur part, (1959) - 207 - affirment constater une

amélioration du déséquilibre biologique après traitement prolongé des athéromateux avec les anticoagulants oraux. Une note divergente est apportée par TSAMBOULAS, CRIKELIS, ANASTOPOULOS et LASANAS (1955) - 208 - qui concluent à l'effet hypercholestérolémiant du dicoumarol chez l'homme, position identique à celle de REINES, HRABANES, VANECEK et MANGAKI (1954) - 209 -.

Les effets des dérivés de la série ont été recherchés non seulement sur le syndrome biologique, mais aussi sur les modifications histologiques accompagnant l'évolution de la maladie. Selon GAULTIER et NOGRETTE (1959) - 210 -, les anticoagulants coumariniques semblent capables d'empêcher l'extension de l'athérome par apparition de nouveaux foyers de thromboses. Le poulet et le lapin soumis à un régime hypercholestérolémié développent un athérome expérimental marqué par des altérations de l'intima et de la media artérielles. Les citroflavonoïdes, selon LEGER, BABIN, BEAUVIEUX et COUSTOU (1960) - 211 - ont, dans ce cas, un effet trophique protecteur sur l'armature élastique des artères. Au total, les résultats publiés dans ce domaine n'emportent pas l'adhésion du fait de la divergence des conclusions des auteurs.

- d) La fragilisation capillaire est observée en particulier au cours du scorbut. Les purpuras, les pétéchies, les hémorragies diffuses gingivales sont des observations cliniques fixées depuis longtemps. La découverte de la vitamine C permet d'empêcher l'apparition du scorbut. Mais les suffusions hémorragiques ne furent maîtrisées qu'après la découverte d'un principe augmentant la résistance

capillaire : la vitamine P, que SZENT GYORGGI isola d'abord sous le nom de citrine (1938) - 212 - à partir des écorces de citron. Ce corps distinct de la vitamine C était en fait un citro-flavonoïde. Il apparut rapidement que plusieurs substances pouvaient être groupées sous le vocable de "vitamine P". En 1947, BEILER et MARTIN - 213 - montrent que la rutine semble protéger l'animal contre les effets œdématisants de la hyaluronidase. Pour ces auteurs, certains composés englobés sous le terme générique de vitamine P semblent beaucoup moins efficaces que la rutine (esculétine, hespéridine - méthyl chalcone). LEVITAN (1948) - 214 - appuie cette hypothèse en démontrant que la rutine administrée à des rats par voie intra-péritonéale, empêche l'extension de l'encre de chine injectée en sous-cutanée en même temps que la hyaluronidase. Finalement, l'idée s'impose [PARROT et COTEREAU (1957) - 215 -] que la ou les vitamines P (flavones, rutine, catéchine) agissent comme facteur d'économie de l'acide ascorbique. L'idée originale de SZENT GYORGGI, des deux vitamines C 1 et C 2 nécessaires pour arrêter le scorbut semble avoir reçu confirmation : GAZAVE - 215 bis -.

De nombreuses méthodes physiologiques très délicates ont permis d'arriver à ces conclusions. En 1945, LAVOLLAY - 216 - applique une ventouse sur la peau épilée du dos du cobaye. Pour une certaine valeur de la dépression créée dans la ventouse, des pétéchies apparaissent plus facilement sur des cobayes carencés scorbutiques. Pour cet auteur et par cette méthode, l'esculine, glucoside dont l'esculétine - dihydroxy coumarine - est l'aglycone, protège les animaux carencés. JAVILLIER et LAVOLLAY (1946)

- 217 - utilisent cette méthode apparemment simple pour tester un grand nombre de structures dans la série qui nous intéresse : flavones, flavonones, cyanidols, catéchines, coumarines. La méthode de la ventouse sera encore appliquée récemment par RIVA, MANTEGAZZA et MASSARANI (1962) - 218 -, les auteurs essayant des dihydroxy coumarines sur des cobayes scorbutiques. Rapidement, l'inconstance de la méthode, la multiplicité des substances trouvées actives et baptisées "vitamines P" obligent les auteurs à rechercher un test plus reproductible. AMBROSE et DE EDS (1947) - 219 - reliant fragilité capillaire, œdème et inflammation, injectent un colorant vital, le bleu trypan, à des lapins dont la peau de l'abdomen est rasée : l'application d'un tampon de chloroforme à cet endroit déclenche un œdème sous-cutané qui se visualise particulièrement bien par le colorant extravasé. La rutine injectée à l'animal retarde l'apparition du bleu trypan : les auteurs confirment par cette méthode l'augmentation de la résistance capillaire conférée par cette flavone. CLARK et GEISSMAN (1949) - 220 - mettent au point une méthode in vitro. Les fibres lisses sont contractées par l'adrénaline ajoutée au bain de survie. Les flavonoïdes habituellement efficaces comme "vitamine P" prolongent l'action spasmogène des catécholamines, en empêchant l'oxydation de ces dernières. Cette méthode ne semble cependant pas spécifique. VINCENT (1959) - 221 - revient à la méthode originale d'AMBROSE et DE EDS, mais il utilise un réflectomètre photoélectrique permettant de préciser, sans coefficient subjectif, le temps d'apparition du colorant sous la peau. Il nomme "Menkinogramme" les courbes donnant l'apparition de coloration en fonction du temps, en hommage à

MENKIN, le biologiste ayant contribué à la connaissance des mécanismes de l'inflammation (1959) - 222 -. L'intérêt de la méthode est aussi d'employer des lapins non carencés : on sait combien il est difficile d'obtenir des niveaux carenciels homogènes dans un lot de lapins ou de cobayes. Pour VINCENT et dans ces conditions, les citroflavonoïdes semblent les plus efficaces, ralentissant au maximum le temps d'apparition du colorant sous la peau. PARIS et MOURY (1964) - 223 - appliquent une méthode identique ainsi que CHARLIER, MOSSLET et CANIVET (1963) - 224 -.

Ce panorama des méthodes, des structures chimiques impliquées et de modes d'action successivement apparus, montre la confusion régnant sur la question.

Les anticoagulants coumariniques déclenchent des hémorragies lors des surcharges médicamenteuses. Les vitamines P sont-elles capables de protéger l'animal et l'homme de ce fâcheux effet ? Même sur ce point, les auteurs ne sont pas d'accord. GLEY et DELOR (1948) - 225 - démontrent que les hydroxy coumarines, antivitamines K, fragilisent les capillaires. PLUNGIAN, MUNCH et WOLFFE (1948) - 226 - concluent que la rutine protège le rat contre les effets hémorragipares du dicoumarol. MARTIN et SWAYNE (1949) - 227 - confirment ces conclusions, indiquant en outre que rutine et catéchine diminuent l'effet hypoprothrombinémiant du dicoumarol sur le rat. Malheureusement, CLARK (1948) - 228 - infirme les résultats de PLUNGIAN et son équipe. Finalement cette prétendue protection par les vitamines P, de l'effet "secondaire" hémorragipare des anticoagulants coumariniques n'a pas reçu une solide consécration scientifique.

e) Cette revue des travaux conduits dans le domaine du système circulatoire ne serait pas complète sans mention des recherches d'auteurs en quête d'hypotenseurs potentiels. La noradrénaline peut être considérée comme l'hormone du tonus vasculaire sympathique. Les auteurs cherchant un effet hypotenseur par effondrement des résistances périphériques, ont pensé à inhiber de façon compétitive la production de la catécholamine. Ces travaux, débutés il y a 15 ans, ont conduit à l'essai de l'alpha méthyl dopa chez l'homme. Au départ, les auteurs ont essayé, comme inhibiteurs compétitifs, les hétérocycles qui nous préoccupent. HARTMAN et CLARK (1953) - 229 - par une méthode respiratoire in vitro en fiole de WARBURG, attribuent une faible activité inhibitrice de la Dopa décarboxylase à certaines chalcones : dihydroxy 3,4 chalcone par exemple. Les auteurs retiennent aussi un enchaînement apparenté : l'acide dihydroxy 3,4 cinnamique. SOURKES (1954) - 230 -, par la même méthode, procède au triage de plusieurs dizaines de substances, retenant la d.catéchine douée de 66 % de l'activité inhibitrice de l'alpha méthyl dopa. HARTMAN et CLARK (1955) - 231 - étendent considérablement leurs recherches, sans trouver une substance dépassant l'activité inhibitrice de l'étalon. L'ombelliférone et, à un moindre degré, les flavones et flavonones, semblent un peu actives dans leurs mains. YUWILER (1958) - 232 - confirme les premiers résultats des auteurs précédents, donnant la trihydroxy 3, 4, 4' carboxy 3' chalcone comme très efficace. Ces recherches ne semblent pas avoir actuellement abouti à une consécration thérapeutique.

Entre temps, GAZET du CHATELIER, DUQUENOIS et GREIB (1955) - 233 - s'attachant à d'autres utilisations de la drogue, reconnaissent à la méthyl 4 hydroxy 7 coumarine, un effet hypotenseur chez le chien endormi ; ils expliquent cette activité - seulement observée avec de hautes doses - par un point d'attaque vasculaire et nerveux. Le produit serait ganglioplégique et spasmolytique musculotrope sur les fibres lisses de la media artérielle. Enfin, récemment, PACMAN et RUBIN - 177 - (loc.cit.) étudient 21 structures comme sympathicolytiques potentiels, retenant la (diéthyl 2' amino éthoxy) 2 chalcone. Le bilan reste, dans ce compartiment, assez négatif quoique les recherches n'aient pas été poussées parfois très loin.

M - CRASE SANGUINE - COAGULATION

Nous avons gardé en dernier le sujet qui nous importe le plus dans le développement de notre travail personnel. Mais avant d'aborder le travail de l'effet anticoagulant de ces hétérocycles, nous devons mentionner des recherches éparses sur l'adhésivité plaquettaire et le pouvoir hémostatique de certaines drogues.

- L'hémostase met en jeu des réflexes vasoconstricteurs, puis des phénomènes impliquant les éléments figurés du sang, en particulier les plaquettes. Ultérieurement, un complexe mécanisme diastasiq déclenche la dénaturation du fibrinogène en fibrine. Quelques auteurs se sont attachés à découvrir dans les anticoagulants coumariniques, dont on admet classiquement l'action au niveau diastasiq terminal, un pouvoir supplémentaire sur le temps plaquettaire. A ce stade, les plaquettes adhèrent à la paroi au niveau de la lésion de l'intima ou de l'endoveine. Puis elles s'agglutinent entre elles, formant, par métamorphose visqueuse, le clou plaquettaire initial, bien retrouvé lors des examens histologiques des caillots intravasculaires.

Pour MURPHY et MUSTARD (1960) - 234 -, chez l'homme, l'index d'adhésivité des plaquettes diminue et leur temps d'agrégation est beaucoup augmenté sous traitement au dicoumarol. MAC NICOL (1965) - 235 - conclut de la même façon en faveur de la phényl indane dione. Pour ces auteurs, l'activité anticoagulante des dérivés coumariniques est donc plus complexe que ne le laissaient prévoir les travaux antérieurs. Il est cependant nécessaire de préciser que les méthodes de mesure des critères en cause :

adhésivité et agrégabilité semblent très discutées par divers auteurs. Les résultats sont peu reproductibles d'une équipe à l'autre, même avec la même méthodologie. Il est donc difficile de conclure actuellement.

- Pour BOSE (1958) - 7 - (loc.cit.) l'hermarine et l'ayapine, deux coumarines méthoxylées sur le noyau benzénique sont hémostatiques in vitro et in vivo sur le lapin.
- La grande consécration pharmacologique et thérapeutique des hétérocycles coumariniques reste cependant liée à leur activité anticoagulante dans le traitement ou la prévention des accidents de coagulation intra-vasculaire.
- . Comme nous l'avons déjà vu pour les œstrogènes, c'est l'observation clinique des animaux ingérant certaine nourriture fourragère qui mit les chercheurs sur la piste de la découverte des anticoagulants actifs par voie orale. SCHOFIELD (1922) - 236 - décrit les premières observations de bovins présentant des hémorragies dues à l'ingestion de melilot gâté. RODERICK (1929) - 237 - attribue cette maladie à la chute du taux des facteurs circulants de la coagulation. Il évoque l'hypothèse d'une influence des coumarines contenues dans le fourrage incriminé. QUICK contribue à ces recherches (1936) - 238 - et met au point à cette occasion (1936) - 239 - la méthode de mesure du taux de prothrombine circulante, méthode largement répandue depuis. Le taux de prothrombine circulante baisse lors de la maladie du melilot gâté induite chez le lapin, mais aussi au cours de certaines jaunisses chez l'homme. Par ailleurs, l'équipe de

LINK s'est attachée, dans les publications de RODERICK, à découvrir l'agent causal de la maladie du melilot gâté. Il s'agit du dicoumarol, isolé (1941), puis synthétisé (1941) - 240 - par STAHMANN, HUEBNER et LINK. Peu après, les premiers essais pharmacologiques et cliniques de la drogue sont entrepris : BINGHAM, MEYER et POHLE (1941) - 241 - MEYER, BINGHAM et AXELROD (1942) - 242 - BUTT, ALLEN et BOLLMAN (1941) - 243 -. La méthode d'administration de la drogue, la posologie, sont précisées ainsi que les premières indications thérapeutiques dans les thrombopathies. Les connaissances sur la structure de la vitamine K, vitamine de la coagulation, dont la carence déclenche les hémorragies par chute du taux de prothrombine, progressent d'un autre côté dans le même temps : DAM et SCHONHEYDER isolent la vitamine (1936) - 244 - que KARRER, GEIGER, RUEGER et SCHWAB (1940) - 247 - synthétisent : il s'agit de la méthyl 2 phytyl 3 naphtoquinone 1,4. ALMQUIST (1941) - 246 - décrit la vitamine K 2 ou méthyl 2 squalenyl 3 naphtoquinone. Cette vitamine K 2 est fournie dans le colon des mammifères par *Escherichia coli*, on la retrouve aussi dans la farine de poisson, alors que la forme K 1 peut être extraite des feuilles vertes de luzerne. DAM (1942) - 247 - fait le point de nos connaissances en ce domaine dans une importante monographie.

A ce moment (1942), les deux antagonistes sont découverts par deux équipes totalement différentes travaillant dans le même temps (1930 - 1942). La première mention d'une liaison structurale entre vitamine K et anticoagulants oraux apparaît alors :

MEUNIER et MENTZER (1943) - 248 - montrent la similitude du dicoumarol et de ce qu'ils pensent être le plus simple des corps doués d'un pouvoir anti-hémorragique : le phticol.

L'idée apparaît d'un "effet antivitamine K". OVERMAN, STAHLMAN et LINK montrent que la vitamine K₁ est l'antidote des hémorragies déclenchées par le dicoumarol (1942) - 249 -.

Le dicoumarol apparaît comme un agent de blocage de la synthèse hépatique de la prothrombine. MEUNIER (1948) - 256 - et QUICK (1951) - 251 - précisent le rôle de cette vitamine.

L'inventaire des diastases intervenant dans le temps plasmatique de la coagulation est conduit activement : QUICK (1942) - 252 - OWREN (1947) - 253 - ALEXANDER et coll. (1949) - 254 - y participent successivement. Les chercheurs en profitent pour compléter l'explication du mode d'action des anticoagulants coumariniques : KOLLER, LOELIGER et DUCKERT confirment que le dicoumarol abaisse non seulement le taux de prothrombine mais aussi celui du facteur VII ou convertine (1951) - 255 -. MOLHO confirme ce mode d'action pour la phényl indane dione (1952) - 256 -.

Finalement, les analogues structuraux du dicoumarol ont en commun les caractères biologiques suivants qui expliquent leur effet anticoagulant :

- inactivité in vitro,
- action sur l'animal par voie orale,
- point d'impact hépatique par blocage des effets de la vitamine K₁ dans la synthèse de la prothrombine,

- existence d'un temps de latence dû à la "disparition", dans le sang, de la prothrombine, des facteurs VI, VIII et IX servant à la dénaturation du fibrinogène,
- rapidité d'action liée à la vitesse d'absorption intestinale,
- normalisation dans des temps variables après arrêt de l'ingestion de l'antivitamine K,
- correction des surcharges dangereuses par la vitamine K 1 ou K 2.

└MOLHO (1953) - 1 - (loc.cit.)┐.

Les derniers travaux tendent à compléter cette explication du mode d'action antithrombotique, soit par un effet plaquettaire - 234 - 235 - (loc.cit.), soit par un effet thrombolytique selon MURPHY et coll. (1963) - 257 -. Il est en tous cas possible de démontrer l'effet protecteur de cette hypocoagulabilité sur l'animal soumis à des facteurs thrombogènes expérimentaux
└RENAUD (1965) - 258 -┐.

- . Les recherches n'ont pas seulement progressé après la découverte du dicoumarol, en vue de connaître le mode d'action de cette drogue singulière. Les biologistes ont rapidement recherché, soit dans la nature, soit par synthèse, des molécules nouvelles actives et plus maniables. Dès 1943, LINK - 259 - étudie les relations possibles entre la structure chimique et l'apparition des effets anticoagulants en partant du dicoumarol. Il paraît alors indispensable de respecter le redoublement de la molécule, le centre de cette dernière étant le pont méthylène.

La synthèse du dicoumarol acétate d'éthyl $\angle$ ROSICKY (1944) - 260 - $\angle$ est faite dans cet esprit. Ce corps est encore utilisé en thérapeutique (éthyl bis-coumacétate). Rapidement, cette théorie ne paraît pas vérifiée. KABAT, STOHLMAN et SMITH synthétisent la pivalyl indane dione (1944) - 261 -. Il s'agit d'une indane trione dont la plus active sera synthétisée quelques années plus tard par CORRELL, COLEMAN et coll. (1952) - 262 -.

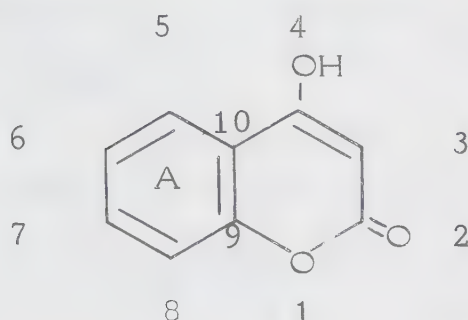
MEUNIER, MENTZER et BUU-HOI synthétisent des dérivés d'hétérocycles de plus en plus éloignés du schéma naturel (1945) - 263 -. En 1947, MEUNIER, MENTZER et MOLHO proposent et confirment sur l'animal l'emploi de la phényl indane dione - 264 -. Les auteurs considèrent qu'il s'agit d'un schéma simplifié des dicoumariniques naturels. La drogue était par ailleurs décrite depuis longtemps - 265 -. SOULIER et GUEGUEN ne tardent pas à vérifier son intérêt chez l'homme (1947) - 266 -. MOLHO (1948) - 267 - 1 - (loc.cit.) et MENTZER (1948) - 268 - poursuivent leurs recherches tendant à définir plus étroitement les conditions d'apparition de l'effet anticoagulant.

STAHMANN, IKAWA et LINK brevettent une hydroxy 4 coumarine non symétrique, (1947) - 269 - d'abord utilisée comme raticide puis proposée en clinique $\angle$ SHAPIRO (1954) - 270 - $\angle$. Dans cette même direction, STOLL et LITVAN présentent une autre hydroxy 4 coumarine, l'aceno-coumarine (1953) - 271 - dont l'activité est confirmée en clinique $\angle$ WALKER (1954) - 272 - $\angle$.

- . Nous résumons ci-dessous les conclusions des chercheurs sur les modifications structurales susceptibles de faire apparaître, d'atténuer ou de faire disparaître l'activité anticoagulante. Ce rappel nous permettra de préciser ultérieurement cette activité biologique dans les molécules étudiées comme anti-inflammatoires ou cholérétiques.

/ A - NOYAU DES COUMARINES /

a) Groupe des hydroxy coumarines



1°) Est favorable à l'apparition d'un effet anticoagulant :

- l'hydroxyle en 4. C'est une condition nécessaire
- la substitution du sommet 3. Condition nécessaire.

Par exemple avec :

- . phényl 3 -
- . bromo 3 -
- . chloro 3 -
- . acétylphényl
- . benzyl

Bibliographie

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 11

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 20

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 11

MEUNIER, MENTZER et
VINET (1946) - 273

MEUNIER et MENTZER
(1945) - 263 - (loc.cit.)

MEUNIER et MENTZER
(1945) - 263 - (loc.cit.)

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 19.

Bibliographie

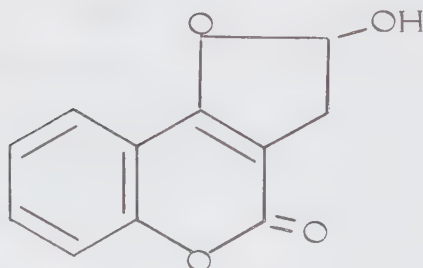
- . une chaîne aliphatique possédant un carbonyle en 5 par rapport à l'hydroxy 4 du noyau.
- . pont méthylène avec redoublement symétrique de la molécule.
- . substitution précédente avec remplacement d'un hydrogène du pont méthylène par divers radicaux.
- . métatoluène.

- remplacement de l'oxygène en 1 par un autre hétéro atome



(à condition que la molécule soit du type "symétrique").

- hémiacétal sur l'hydroxy 4 coumarine, par exemple :



MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 20 aussi
OVERMAN, STAHMANN
et coll. (1944) - 274 -

OVERMAN, STAHMANN
et coll. (1944) - 274 -
(loc.cit.)

LINK (1943) - 259 -
(loc.cit.)

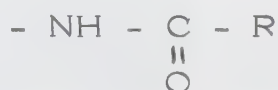
BROCADES - B.S.M.
(1965) - 275 -

MOLHO (1953) - 1 -
(loc.cit.) p. 9

ARORA et MATHUR (1963)
- 276 -

2°) Est défavorable à l'apparition de l'effet anticoagulant :

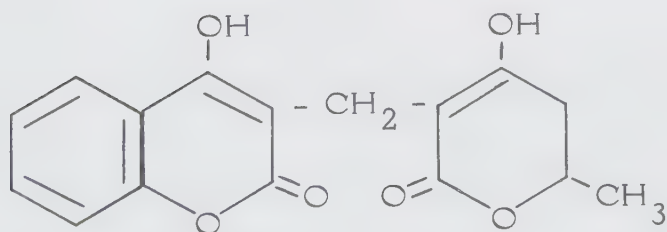
- l'ouverture du noyau benzénique A
- la substitution des sommets du noyau benzénique A
 - . particulièrement la présence d'hydroxyle en 5,6,7,8.
- certaines substitutions du sommet 3 :



D'après ces auteurs, la méthyl 3 hydroxy 4 coumarine serait provitamine K.

- pont méthylène avec une structure non symétrique.

Par exemple :



Bibliographie

MOLHO - 1 - (loc.cit.)p.13

MENTZER - 268 -
(loc.cit.)

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 14

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 12

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 12

MEUNIER et MENTZER
- 248 - (loc.cit.)

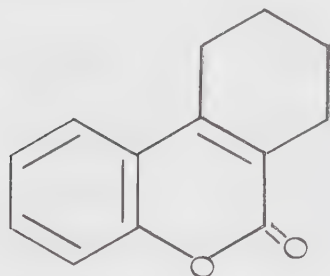
MEUNIER, MENTZER et
VINET - 273 - (loc.cit.)

Bibliographie

b) Groupe des coumarines non hydroxylées.

_____erait favorable à l'activité anticoagulante :

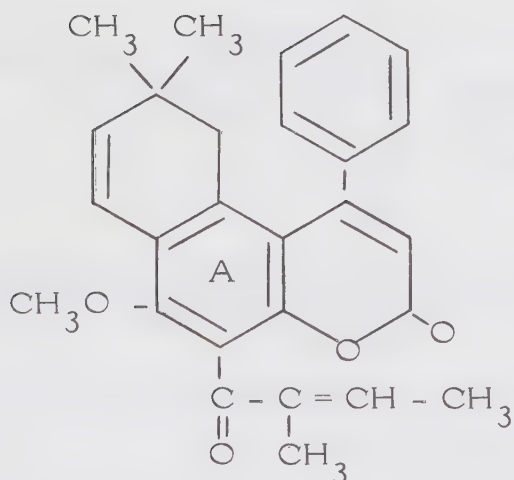
- le cyclo hexane 3,4 coumarine



KAUFMAN p. 415
- 277 -

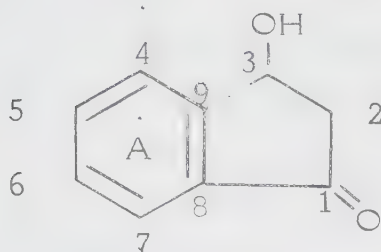
- la phényl 4 coumarine dans le callophyllolide

ARORA, MATHUR et
SETH - 179 - (loc.cit.)



Il faut noter que cette structure n'a aucune substitution en 3, qu'elle a de nombreuses charges du noyau A et aucun hydroxyle en 4. Toutes conditions décrites par ailleurs comme défavorables.

B - NOYAU DES ARYL INDANE DIONES



Bibliographie

1°) Est favorable à l'activité anticoagulante

- la présence du radical arylique en 2 - condition nécessaire - (surtout $= -C_6H_5$)

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 38

- la charge du radical phényl 2 :

KAUFMAN - 277 - (loc.cit.)

- . L'activité croît avec les halogènes, les radicaux électro-négatifs (NO_2 par exemple) .

KOVALCIK, PECHAN, SMIESKO et FISCHER-KOVA (1959) - 278 -

- et les substitutions thiocyno -

KOPTELOVA (1962) - 279-

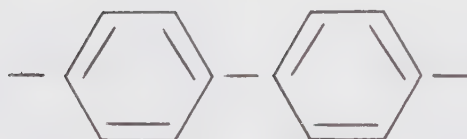
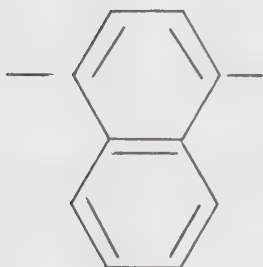
- . Elle diminue avec les autres constituants.

- . La position para est privilégiée

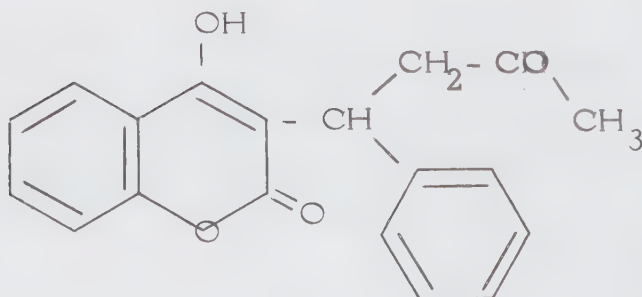
- . Quand il y a 2 substituants sur le phényl 2, il en faut un en position para.

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 34.

- le substituant naphthyl en 2
- une autre substitution arylique en 2 - pont arylique -



- une certaine configuration spatiale de la molécule permettant de figurer un cycle potentiel, rapprochant les structures de celles des hydroxy 4 coumarines.



Warfarine

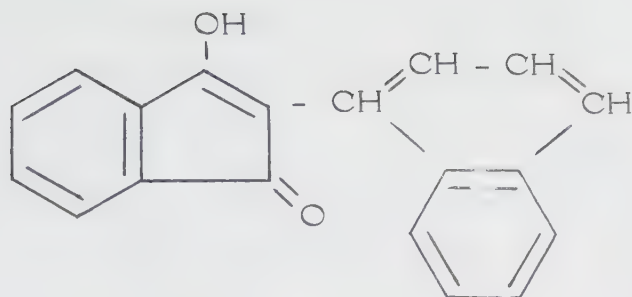
Bibliographie

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 33.

GUMINSKA, ECKSTEIN
et STACHURSKA (1964)
- 280 -

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 38

et MOLHO (1954) - 281 -



α naphtyl 2 indane dione 1,3

2°) Est défavorable à l'activité

- la symétrie moléculaire par rapport à un pont méthylène en 2
- une chaîne latérale pyridyl 2
- une chaîne latérale alkyl ou ester en 2, ce qui modifie totalement la forme de la molécule
- la suppression des deux cétones
- la présence d'une seule cétone sur le cycle pentagonal
- la charge du noyau benzénique A :
 . par un halogène
 . par un méthoxy
- la suppression des possibilités de tautomérisation de la molécule :

Bibliographie

JANSEN et JENSEN (1942)
- 282 -

MOLHO - 284- (loc.cit.)

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 33

MEUNIER, MENTZER et
MOLHO - 264 - (loc.cit.)

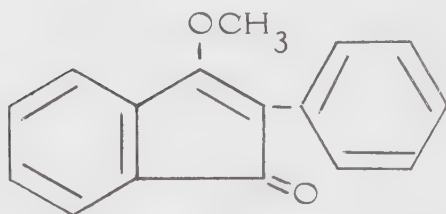
MOLHO - 284- (loc.cit.)

PASERO et MARINI (1958)
- 283 -

Bibliographie

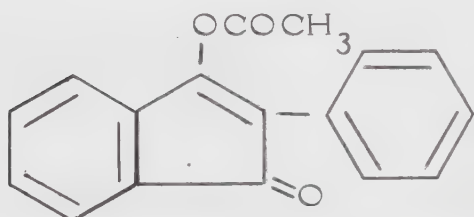
- . par blocage sous forme enol
par méthylation

MOLHO - 281 - (loc.cit.)



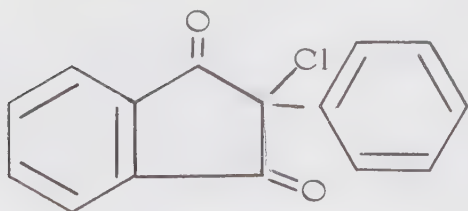
- . par blocage sous forme enol
par acétylation

MOLHO - 281 - (loc.cit.)



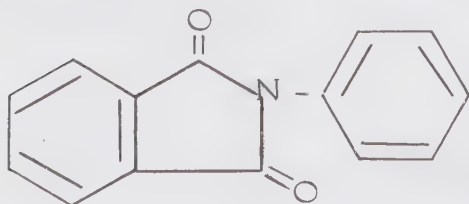
- . par blocage sous forme céto-
nique avec halogénéation ou
substitution alkyl en 2

idem.



- . ou par introduction d'un
azote en 2

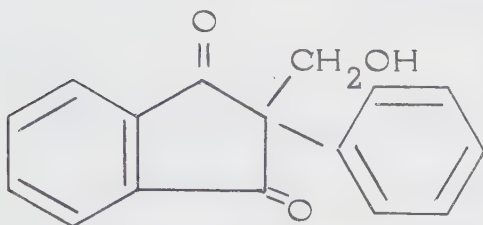
MOLHO - 281 - (loc.cit.)



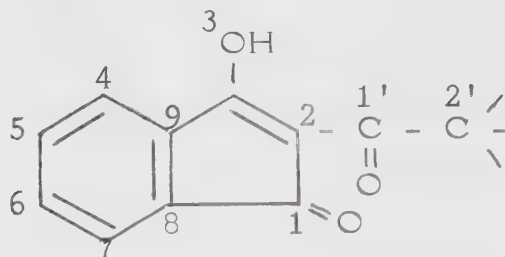
Bibliographie

KOPTELOVA (1962)
- 284 -

A noter cependant les conclusions
contradictaires de certains auteurs
indiquant l'activité anticoagulante de
structures telles que celle-ci :

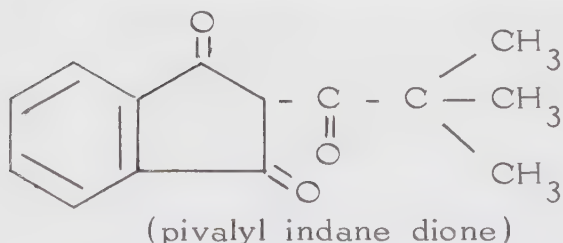


/ C - NOYAU DES ACYL INDANE DIONES /



) Est favorable à l'activité anticoagulante :

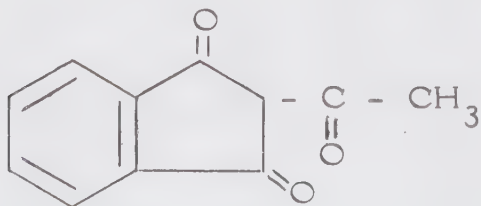
- la possibilité de tautomérisation
- la charge de la chaîne latérale sur le carbone 2'
- . soit avec les radicaux alkyl



- . soit avec les radicaux aryliques, encore plus efficaces.

) Paraît défavorable :

- la non substitution du carbone 2'



Bibliographie

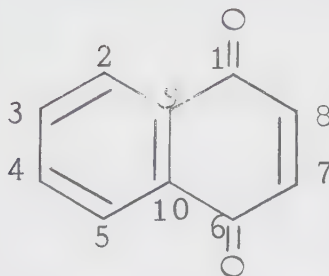
MOLHO - 1 - (loc.cit) p. 7

KABAT, STOHLMAN et SMITH - 261 - (loc.cit.)

CORRELL, COLEMAN et coll. - 262 - (loc.cit.)

MOLHO - 1 - (loc.cit.) p. 33

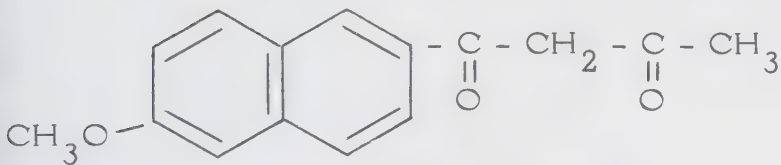
/ D - NOYAU DU NAPHTALENE ET DE LA NAPHTOQUINONE 1,4/



En général, les activités sont faibles dans cette série.

°) Est favorable à l'activité anticoagulante :

- une chaîne dicétonique en 2
pouvant s'enoliser



- la substitution chloro 2 - sur les
naphthoquinones 1,4
- les substitutions chloro 2 hydroxy 3 -
- la substitution méthoxy 2 et alkyl 2
- le redoublement de la molécule
autour d'un méthylène central.

Bibliographie

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 29 bis.

LOWENTHAL et MAC
FARLANE (1965) - 285 -

SMITH, FRADKIN et
LACKEY (1946) - 286 -

MOLHO - 1 - (loc.cit.) p.26
et MOLHO - 267 - (loc.cit.)

MEUNIER, MENTZER et
VINET - 273 - (loc.cit.)

°) Semble défavorable :

- la substitution méthyl en 3
 - la substitution hydroxyle en 2
 - les substitutions hydroxy 2
méthyl 3 : (phticol)
- (alors que le méthylène diphticol
semble légèrement actif)

Bibliographie

MEUNIER, MENTZER et
BUU-HOI - 263 - (loc.cit.)

MOLHO, MOREAUX et
MEUNIER - 267 - (loc.cit.)

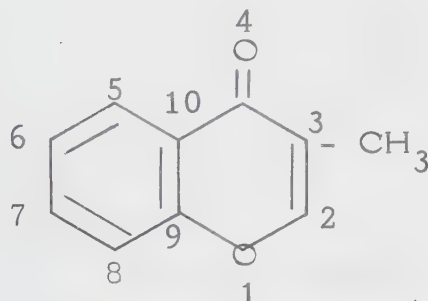
MEUNIER, MENTZER et
BUU-HOI - 263 - (loc.cit.)

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 6.

E - AUTRES NOYAUX

Les activités antivitaminiques K sont toujours faibles.

CHROMONES



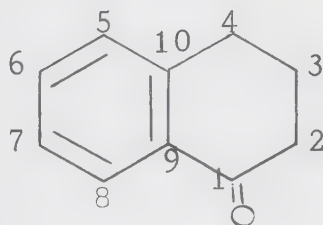
- la dichromone semble efficace
- au contraire, la méthyl 3 chromone semble douée d'un effet vitaminique K.

Bibliographie

MENTZER (1947) - 287 -

MENTZER et MEUNIER
(1944) - 288 -

TETRALONES

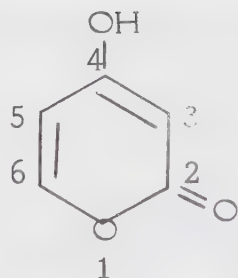


- l'acétyl 2 tétralone est un peu anticoagulante.
- la tétralone, la benzoyl-tétralone, la butyroyl-tétralone, sont inefficaces.

MOLHO - 1 - (loc.cit.) p.23

MOLHO - 1 - (loc.cit.) p.23

ALPHAPYRONES



De toutes celles essayées, aucune n'a montré d'efficacité anticoagulante.

Bibliographie

MOLHO - 1 - (loc.cit.)
p. 13

En résumé, les corps de la série les plus anticoagulants se recrutent parmi les hydroxy 4 coumarines, les aryl 2 indane diones 1,3 et les acyl 2 indane diones 1,3.

III - CONCLUSIONS DU PREMIER CHAPITRE

Au terme de cet exposé, il est clair que naturalistes, biochimistes, chimistes, organiciens, pharmacologues et cliniciens manifestent un intérêt soutenu pour les substances qui nous préoccupent.

Divers résultats thérapeutiques ont sanctionné ces travaux. Mais la biologie fondamentale a eu sa part, si l'on considère le fructueux exemple de l'inhibition biologique compétitive par analogie structurale, dans le couple vitamine K - anticoagulants.

-:-:-:-

DEUXIEME CHAPITRE

PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DE QUELQUES DERIVES

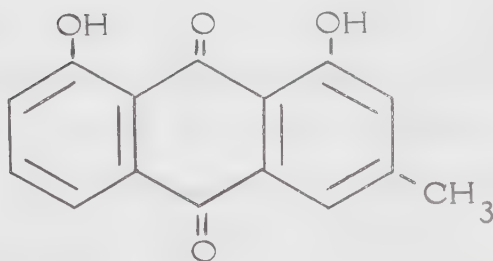
DES ALPHA, GAMMA PYRONES ET CORPS VOISINS

I - INTRODUCTION - PLAN DU CHAPITRE

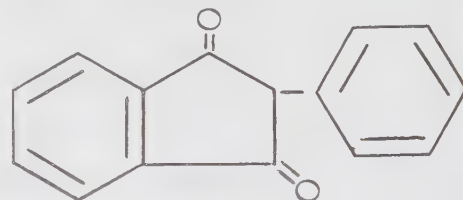
Quelques constatations, jusqu'à un certain point contradictoires, ont attiré notre attention sur la présence possible d'une activité anti-inflammatoire dans la série chimique des coumarines et indane diones :

- Tout d'abord, certains auteurs ont montré que les flavones, corps voisins des coumarines, inhibent l'inflammation locale expérimentale : EKMAN (1947) - 289 - HALPERN (1949) - 290 - KUCHLE (1951) - 291 - FERLUX (1966) - 292 - ROUSSEL (1966) - 293 -. Ces corps semblent agir par arrêt de la diffusion plasmatique au niveau capillaire. Les citro-flavonoïdes - 213 - 214 - 219 - (loc.cit.) en particulier diminuent la perméabilité capillaire induite par la leucotaxine, substance extraite des exsudats inflammatoires par MENKIN (1959) - 294 -. Ces flavones sont donc des inhibiteurs de la fragilisation capillaire.
- D'un autre côté, il est bien admis que les anticoagulants antivitaminiques K sont des fragilisants capillaires : - 225 - 226 - 227 - (loc.cit.). SEEBERGER (1959) - 295 - explique ainsi leur pouvoir hémorragipare.
- Enfin, des observations cliniques éparses évoquent la possibilité d'un pouvoir anti-inflammatoire :
 - . De nombreux travaux confirment l'effet antigoutteux du biscoumacétate d'éthyl et de la phényl indane dione - 157 - 158 - 159 - 160 - 161 - 162 - (loc.cit.). Très souvent, les médicaments uricosuriques sont aussi anti-inflammatoires et antirhumatismaux (aspirine - phénylbutazone).

Des cliniciens ont utilisé l'acide chrysophanique en pommade comme antisuivant dans le traitement de l'eczéma. On a proposé l'emploi de la phényl indane dione dans la même indication, la structure chimique des deux corps paraissant voisine à certains égards.



Acide chrysophanique



Phényl indane dione

De bons résultats cliniques ont alors été signalés dans le traitement des œdèmes des membres inférieurs et des séquelles phlébitiques où la pommade à base de phényl indane dione semble agir comme désinfiltrant : signalons les résultats de VAIRE, COTTE et MOLHO (1953) - 296 -, ROUSSELLE (1958) - 297 - et HEYBLON (1960) - 298 -.

La découverte d'un effet anti-inflammatoire permettrait d'expliquer le mode d'action de la phényl indane dione dans ces indications. L'extension des recherches aux anticoagulants coumariniques utilisés permettrait de faire le partage entre les potentialités contradictoires de ces molécules : anticoagulante et hémorragipare d'un côté, anti-inflammatoire ou protectrice capillaire de l'autre. Finalement, ces recherches pourraient conduire à la découverte de nouveaux anti-inflammatoires, si possible non anticoagulants.

Dans une première partie de ce chapitre, nous procéderons à l'examen critique des diverses méthodes d'étude des activités anti-inflammatoire et anticoagulante. Nous justifierons les méthodes retenues dans notre travail personnel, nous préciserons notre choix du mode d'expression des résultats, qui doit être adapté à un triage pharmacologique.

Dans une deuxième partie, nous rechercherons une éventuelle activité anti-inflammatoire dans les anticoagulants connus de la série des coumarines, des aryl indane diones et acyl indane diones. La phényl 2 indane dione 1,3 retiendra plus particulièrement notre attention.

Dans une dernière partie, nous étudierons des structures chimiques nouvelles ou dont l'activité pharmacologique est inconnue, du double point de vue des effets anticoagulants et anti-inflammatoires, afin de localiser les molécules actives ou celles présentant une éventuelle dissociation des deux réponses pharmacologiques. Nous chercherons à dégager les relations entre la structure moléculaire et les effets biologiques. Ce travail concerne 53 substances : flavones, chromones, alpha pyrones, coumarines, hydroxy coumarines, aryl indane diones et acyl indane diones.

- METHODES D'ETUDE EMPLOYEES DANS LA RECHERCHE

DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

Il s'agit de choisir un moyen de contrôle rapide du pouvoir anticoagulant et anti-inflammatoire. Les tests choisis doivent être suffisamment précis, reproductibles et doivent utiliser le minimum de substances chimiques. Dans quelques cas, les quantités de substance disponibles ont été si faibles que, malgré les précautions prises dans le choix des méthodes, il n'a pas été possible de conduire à bien la totalité des essais prévus.

1 - MESURE DE L'ACTIVITE ANTICOAGULANTE

A - Critique des méthodes d'étude existantes - les raisons de notre choix -

L'emploi des anticoagulants coumariniques nécessite un strict contrôle biologique des malades. Le pharmacologue a donc le choix parmi les divers tests possibles, dès lors qu'il utilise un mammifère comme animal d'étude, dont les réponses biologiques sont qualitativement les mêmes que celles de l'homme.

/ Les divers tests utilisables /

- Le "P and P test" d'OWREN (1951) - 299 - tient compte non seulement du taux de prothrombine circulant dans le sang, mais aussi de celui de proconvertine ou facteur VII. L'auteur précise que le test serait plus complet et partant plus précis que celui mesurant seulement le taux de prothrombine. Ce test n'a pas été employé sur l'animal, à notre connaissance, de façon itérative.
- La thrombélastographie de HARTERT (1948) - 300 - est une méthode cinétique, mesurant le temps de coagulation d'un plasma décalcifié, recalcifié au moment de la mise en place dans la cuve tournante d'un appareil muni d'un cylindre plongeur. Lors de la coagulation, le cylindre devient solidaire de la cuve et se trouve animé du même mouvement de va-et-vient. Les mouvements sont enregistrés par une caméra cinématographique. La technique, très délicate, semble cependant au point sur l'homme et permet un contrôle assez

complet des divers temps de la coagulation. Malheureusement, les auteurs tels DE NICOLA, CAPPELLETTI et SARTORI (1957) - 301 - trouvent de grandes variations spontanées de ces divers paramètres sur l'animal. Notre expérience personnelle confirme ce résultat. De plus, l'appareil n'est muni que de trois cuves et ne permet pas un rendement suffisant.

- Plus récemment, OWREN a proposé en clinique, le "Thrombo-test", qui est encore présenté comme un perfectionnement de la technique originale de QUICK : il s'agit cette fois OWREN (1959) - 302 - 303 - 7 de tenir compte des facteurs extrinsèques (thromboplastine tissulaire) et intrinsèques (thromboplastine circulante) qui interviennent en deux temps dans la coagulation, alors que le temps de QUICK original ne met en jeu que les thromboplastines tissulaires. Cette méthode récente ne s'est pas imposée en clinique. Elle ne paraît pas apporter de progrès décisifs. Elle nécessite l'emploi d'un réactif seulement vendu par l'inventeur. Nous n'en connaissons pas d'application sur l'animal.
- Finalement, nous avons retenu la méthode la plus ancienne, celle de QUICK - 238 - (loc.cit.). C'est aussi la méthode la plus employée à la fois en clinique et en pharmacologie animale.

Le sang de l'animal est décalcifié. A 37° C, on note le temps de coagulation du plasma auquel on a ajouté un excès de calcium ionisé et un extrait d'organe riche en thromboplastine tissulaire : dans ces conditions, le temps de coagulation dépend essentiellement de la quantité de prothrombine contenue dans le plasma étudié. Sans prétendre être exhaustifs, nous voyons

que de nombreuses équipes ont adopté ce test pour étudier, chez diverses espèces de mammifères, l'évolution de la coagulation sous l'influence de substances coumariniques. La plupart du temps, le choix des auteurs s'est fixé en raison de la bonne reproductibilité des résultats, de la faible quantité de sang nécessaire (2 à 3 ml au plus), du parallélisme assez étroit entre les résultats pharmacologiques et cliniques, de la grande cadence de travail possible avec un matériel peu onéreux : la plupart des auteurs que nous citons avaient à résoudre un problème similaire au nôtre : le triage pharmacologique des drogues. Citons BINGHAM, MEYER et POHLE - 241 - (loc.cit.), OVERMAN, LINK et coll. - 249 - (loc.cit.), MURPHY - 257 - (loc.cit.), KABAT - 261 - (loc.cit.), CORRELL - 262 - (loc.cit.), SOULIER - 266 - (loc.cit.), MONTIGEL et PULVER (1954) - 304 -, STOLL et LIVAN (1954) - 305 -, TRCKA (1954) - 306 -, GORI et MOLTE-
NI (1954) - 307 -, DAM et coll. (1954) - 308 -, CAVALLI-
NI, MIELLA et GIUMELLI (1955) - 309 -, MOLHO - 1 -
(loc.cit.), BLAKE, ASHWIN et JAKUES (1959) - 310 -
KOVALCIK, VALACH et coll. (1960) - 311 -, ARORA
- 276 - (loc.cit.), LOWENTHAL et MAC FARLANE (1965)
- 285 -, RENAUD - 258 - (loc.cit.). Ces noms représen-
tent les équipes les plus importantes ayant travaillé sur ce
problème dans les quinze dernières années.

/ Le choix de l'espèce animale /

De nombreux travaux donnent les valeurs comparatives du temps de QUICK dans diverses espèces, citons : QUICK (1938) - 313 - (1948) - 314 -, MURPHY et SEEGER (1948) - 315 -, ALBRITTON (1952) - 316 -, WARTELLE (1958) - 317 -, FLORIO, COTTEREAU, MARIE et MARIE (1959) - 318 -, DIDISHEIM, MATTORI, LEWIS et PITTSBURGH (1959) - 319 -, CAILLARD, DEVANT et KLEPPING (1960) - 320 -, ROWSELL (1964) - 321 -. Ces bases bibliographiques abondantes citent le rat, le lapin, le chien, le cobaye, le poulet et comparent les valeurs obtenues à celles trouvées chez l'homme.

Le choix des auteurs devant résoudre des problèmes de triage pharmacologique se limite en pratique au rat, au lapin et au chien. Très peu d'auteurs utilisent le chien dont l'emploi nécessite de grandes quantités de produit et n'autorise que de faibles lots d'expérience : par exemple, MILLAR, HENRIET et JACQUES (1965) - 322 -, BINGHAM et coll. - 241 - (loc.cit.). Finalement le lapin est de loin l'animal le plus utilisé par les chercheurs. Rappelons, parmi les auteurs déjà cités : MOLHO - 1 -, OVERMAN et coll. - 249 -, KABAT - 261 - CORRELL - 262 -, SOULIER - 266 -, ARORA - 276 -. Nous avons suivi le même choix : le lapin nous a donné, comme nous le verrons plus loin, un bon groupement des paramètres biologiques normaux. Cet animal est bien le plus sensible à l'activité antivitaminique K des coumarines. Son emploi permet d'écarter la structure chimique dépourvue d'effet anticoagulant. Son temps de QUICK se situe parmi les plus courts décrits

(entre 6 et 11 secondes pour les auteurs déjà cités) et selon QUICK lui-même, le raccourcissement du temps de prothrombine est toujours favorable à la précision de la méthode [QUICK - 314 - (loc.cit.)]. Les animaux présentent, comme l'homme, un seuil de danger correspondant au taux de 10 % de prothrombine. En-dessous de cette valeur, il y a risque d'hémorragies spontanées dans les deux espèces. La veine marginale de l'oreille permet des prélèvements journaliers multiples, assurant un contrôle biologique du même animal pendant plusieurs jours après l'ingestion d'une dose de charge. Enfin, son faible poids relatif autorise l'emploi de petites quantités de substance aux essais. Nous n'avons cependant pu faire choix d'une race précise par manque de source valable. Le groupement des résultats ne semble absolument pas en souffrir. Nous avons tenu cependant à n'utiliser toujours qu'un seul sexe et des animaux assez jeunes. Finalement, notre choix s'est porté sur des lots de jeunes lapins mâles de race commune, à pelage gris, ne pesant pas plus de 2,5 à 3 kg au départ.

/ Les conditions d'exécution du test /

L'exécution du test est délicate et les variations observées chez les auteurs cités sont dues à des choix variés sur les points suivants :

- . préparation de la verrerie
- . nature de l'anticoagulant servant à recueillir le sang
- . méthode de récupération du plasma
- . nature de la thromboplastine employée
- . délai d'expérience.

Voyons rapidement ces divers points :

- La verrerie :

Problème important rarement exposé par les auteurs. Il faut empêcher toute cause de coagulation dans les tubes à centrifuger, pipettes, tubes à hémolyse, etc... Toute microcoagulation, peu visible dans le sang total, fausse les résultats de cette mesure enzymatique par engagement du processus hors du contrôle de l'opérateur. Toute souillure protéique suffit à favoriser le phénomène. Nous avons décidé de traiter toute la vaisselle par trempage dans une solution sulfochromique (volume égal d'acide sulfurique concentré et de solution aqueuse de bichromate de potassium à 10 %) pendant une semaine, suivi d'un rinçage à l'eau ordinaire puis distillée. Ces conditions opératoires semblent nous avoir mis à l'abri de réponses erratiques trop nombreuses.

- L'anticoagulant de recueil in vitro - la récupération du plasma :

Les deux décalcifiants les plus employés sont le citrate trisodique et l'oxalate de sodium. Le citrate complexe le calcium sérique, l'oxalate d'insolubilise. L'oxalate paraît mieux défini que le citrate. Finalement, comme MOLHO - 1 - 281 - (loc. cit.), FLORIO et coll. - 318 - (loc. cit.), nous avons opté pour l'emploi d'une solution aqueuse d'oxalate de sodium titrant 1,341 g pour 100 ml. L'anticoagulant en solution est déposé dans la seringue avant le prélèvement de telle façon que le sang recueilli soit immédiatement mélangé. La seringue pleine est agitée plusieurs fois lentement, et le contenu, transvasé dans un tube à fond rond, est centrifugé immédiatement à 1.200 tours/minute. Le plasma est ainsi récupéré le plus rapidement possible.

- Nature de la thromboplastine employée :

Il s'agit d'une thromboplastine tissulaire. Elle doit donner des résultats assez groupés d'un lot à l'autre. Mais cette stabilité n'exclut pas une pureté suffisante pour avoir la plus grande rapidité possible. En fait, les auteurs indiquent généralement l'emploi d'extraits acétoniques de cervelle [FLORIO - 318 - (loc.cit.), DIDISHEIM - 319 - (loc.cit.)], de poumon ou de mélange des deux.

Nous avons utilisé une thromboplastine extraite de la cervelle de lapin, contenant un excès de calcium ionisable (thromboplastine GEIGY). Cette présentation en comprimés permet une préparation extemporanée. Les réponses sont toujours très rapides (moins de 7 secondes comme temps de QUICK normal). Le produit préparé peut servir toute une journée sans modification de la réponse. Cette préparation semble répondre aux exigences récemment définies par KOZIOL (1962) - 323 - pour ce type de réactif. Nous utilisons systématiquement un animal témoin dont la réponse nous assure de la valeur du réactif reconstitué. Nous rejetons toute préparation donnant, avec le plasma d'un lapin normal, un temps de plus de 6,8 secondes ou de moins de 4,8 secondes).

- Il ne s'écoule jamais plus de deux heures entre le moment du prélèvement du sang veineux sur l'animal et celui de la mesure du temps de QUICK. Les plasmas sont toujours séparés immédiatement après le prélèvement. La plupart des causes d'erreurs expérimentales semblent ainsi écartées. Au total,

1 à 2 ml de sang veineux sont recueillis sur 0,1 à 0,2 ml d'oxalate de sodium. Le mélange immédiatement centrifugé à 1.200 tours permet la séparation du plasma. A 0,1 ml de plasma déposé dans des tubes à hémolyses stockés en bain-marie à 37°, nous ajoutons brusquement 0,2 ml d'une suspension fraîche de thromboplastine calcifiée (1 comprimé de thromboplastine calcifiée GEIGY pour 2,5 ml d'eau distillée). Le réactif thromboplastinique aura muri 15 minutes dans le bain-marie à 37° C avant l'emploi. Le temps de coagulation est noté par inclinaisons régulières du tube.

/ L'expression de la mesure /

Le résultat immédiat s'exprime en "temps de QUICK". C'est le temps de coagulation après addition de la thromboplastine calcifiée dans le plasma. Il est plus intéressant de rapporter ce temps à un taux de prothrombine. On peut construire une courbe montrant le déficit enzymatique en fonction du produit ingéré par l'animal. Il suffit de convertir les temps de coagulation en taux de prothrombine. Nous préparons cette courbe pour un lot de 120 lapins normaux, le travail s'étant étendu sur plus d'une année, ce qui nous a permis de vérifier l'absence d'éventuelles variations saisonnières du temps de QUICK normal de nos lapins. Le taux 100 % de prothrombine correspond au temps de coagulation du plasma normal. Nous avons dilué ensuite le plasma à 40 %, 20 % et 10 % avec une solution physiologique, et déterminé les temps de QUICK correspondants, définissant ainsi les points donnant 40 %, 20 % et 10 % du taux de prothrombine plasmatique.

Nous n'avons pas défini de valeurs entre le plasma pur et sa dilution à 40 % car la différence est faible : de l'ordre de moins d'une seconde, ce qui donne une portion linéaire entre ces deux limites sur un tel type de courbe. D'ailleurs certains auteurs [CAVALLINI et MIELLA - 309 - (loc.cit.)] estimant la différence trop faible entre les points 100 % et 50 %, commencent leurs essais en diluant d'emblée les plasmas de lapins à 50 % avec un sérum physiologique.

Nous diluons nos plasmas non pas avec un sérum physiologique mais avec une solution aqueuse physiologique (à 9 o/oo de ClNa) de fibrinogène bovin (Armour). En effet, dans les grandes dilutions (20 % et 10 %), la mesure peut être faussée par le déficit en fibrinogène qui devient à son tour un facteur limitant de la réaction. Cette solution servant aux dilutions titre 3,5 g par litre de fibrinogène. C'est le taux de fibrinogène plasmatique trouvé dans notre laboratoire sur l'animal d'expérience choisi, selon la méthode pondérale rappelée par MANET et MOURAD (1963) - 324 -.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les valeurs expérimentales ayant servi de base à la construction de la courbe de dilution type.

Dilution	Nombre d'essais	Moyenne des temps de Quick	Ecart type de la moyenne			Nombre de résultats à		
			σ	2σ	3σ	$\pm \sigma$	$\pm 2\sigma$	$\pm 3\sigma$
						(et pourcentages correspondants)		
100 %	121	5,8	0,5	1	1,5	81 66,94 %	119 98,33 %	120 99,17 %
40 %	119	8,8	1	2	3	91 76,5 %	117 98,3 %	119 100 %
20 %	118	13,6	1,8	3,6	5,4	85 72 %	113 95,8 %	118 100 %
10 %	118	23,1	2,6	5,2	7,8	77 65,25 %	107 90,7 %	117 99,1 %

Tableau 4

Temps de Quick du plasma de lapin à diverses dilutions

Notons que, dans le cas de distribution gaussienne, les valeurs des pourcentages théoriques correspondant aux trois dernières colonnes sont de :

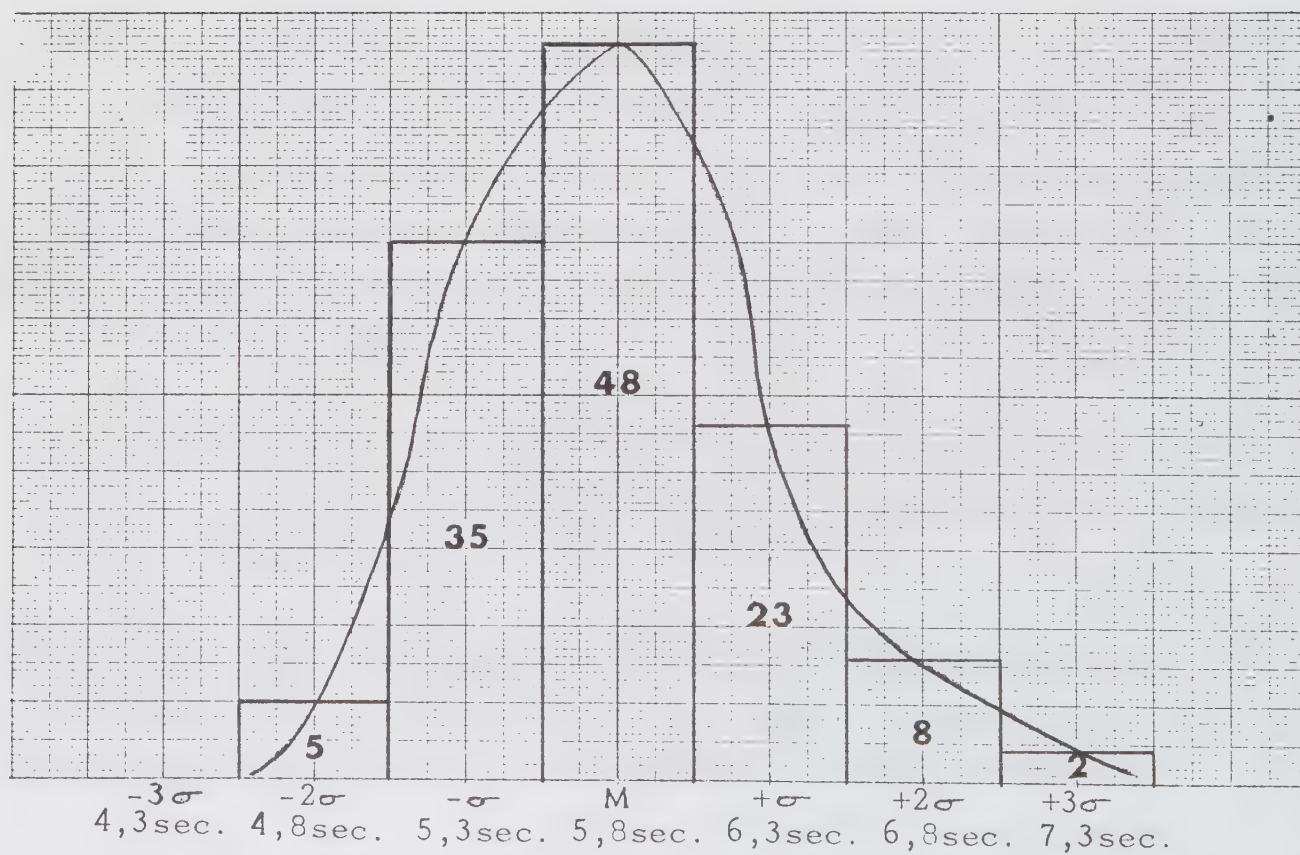
$\pm$: 68,3 % des résultats
 $\pm$: 95,5 % des résultats
 $\pm$: 99,7 % des résultats.

Nous voyons qu'il existe une bonne corrélation entre la dispersion de nos mesures expérimentales et celles d'une distribution normale d'un tel paramètre biologique, ce qui est confirmé d'autre façon, en utilisant la méthode des histogrammes.

Graphique n° 1

Répartition des 121 échantillons

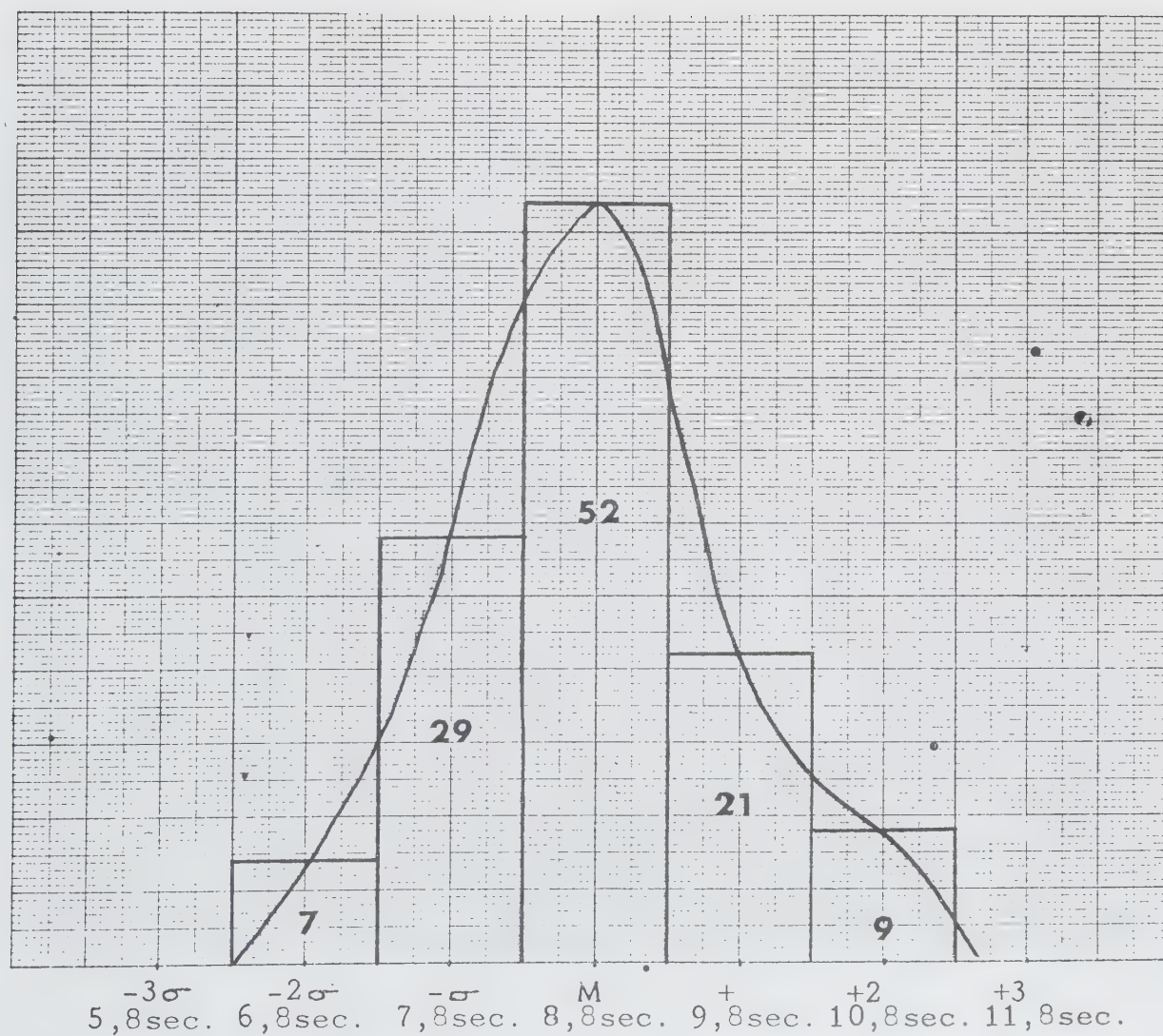
"Dilution 100 %"



Graphique n° 2

Répartition des 119 échantillons

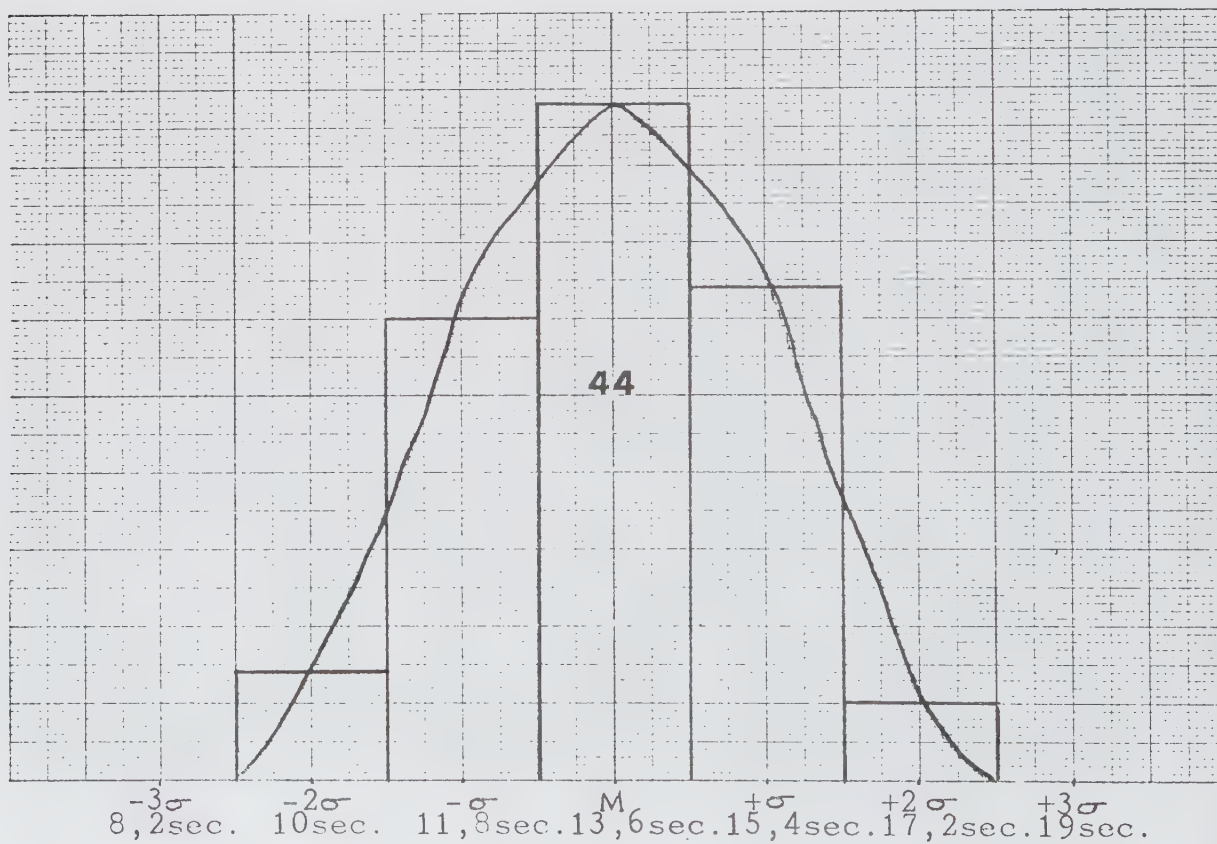
"Dilution 40 %"



Graphique n° 3

Répartition des 118 échantillons

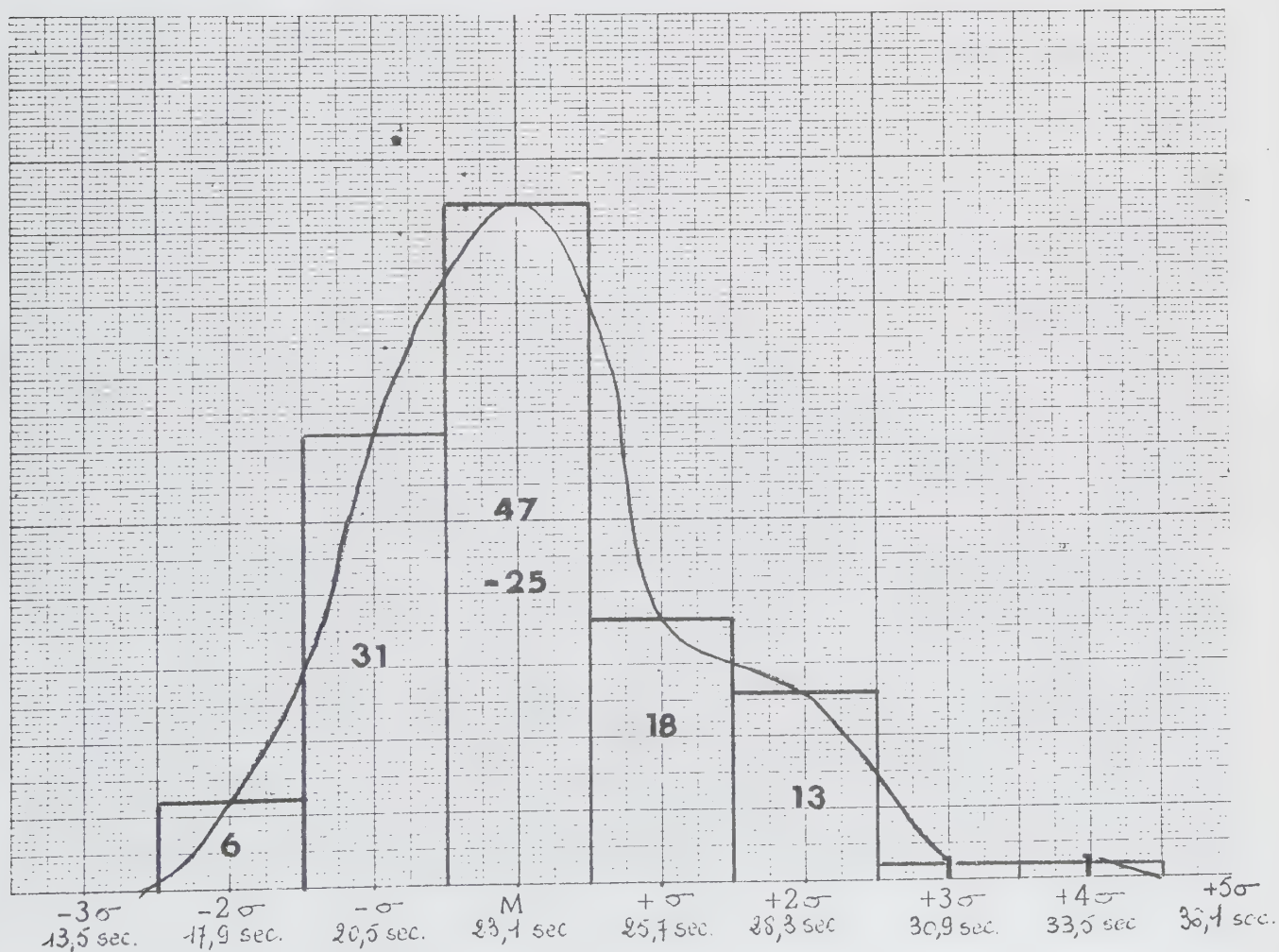
"Dilution 20 %"



Graphique n° 4

Répartition des 118 échantillons

"Dilution 10 %"



Ces histogrammes montrent qu'aux erreurs d'expérience près, (particulièrement pour la dilution la plus extrême) la distribution est homogène et symétrique, donc de type gaussien, selon LAMOTTE (1948) - 325 -.

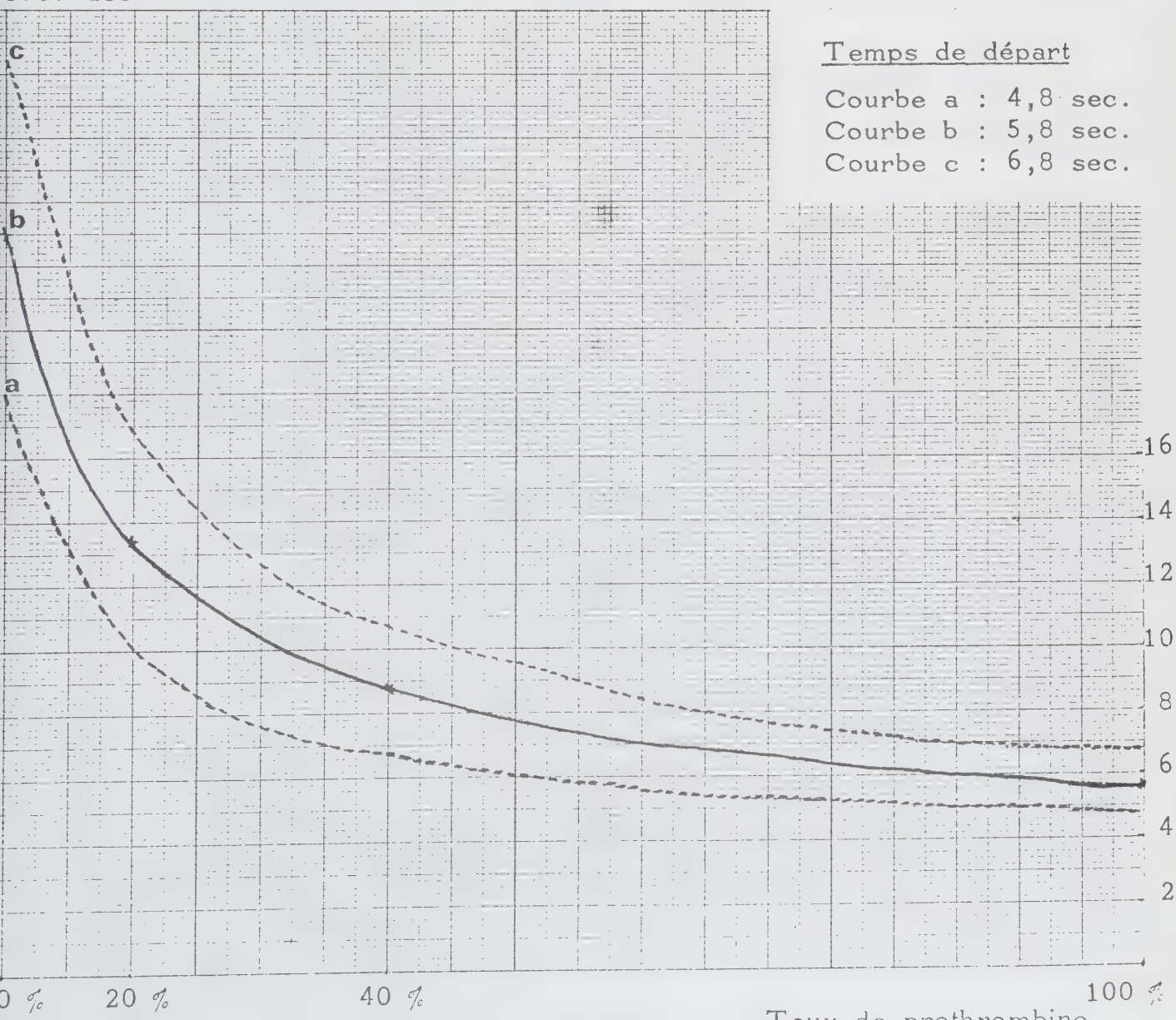
Nous avons construit la courbe type des dilutions, valable dans le cadre de nos essais (graphique n° 5). Ce graphique indique l'évolution du taux de prothrombine du lapin normal en fonction du temps de QUICK. Les deux courbes pointillées indiquent l'écart correspondant à ± 2 écarts-types et donnent les limites extrêmes de la "normalité".

Graphique n° 5

Relation entre le temps de QUICK et le taux de prothrombine

chez le lapin normal

Temps de Quick
secondes



Nous pouvons ainsi vérifier :

- la réponse biologique initiale de nos animaux avant tout traitement ; le temps de QUICK doit se situer aux environs de 5,8 secondes (4,8 - 6,8 secondes). Nous rejetons tous les animaux situés hors de ces limites, ce qui nous est très rarement arrivé.
- après ingestion d'une dose de charge par les animaux, les temps de QUICK journaliers qui sont transformés en taux de prothrombine en utilisant la courbe étalon précédemment définie.
- chaque jour, la valeur de la thromboplastine utilisée, puisqu'un lapin témoin sert à contrôler la stabilité du temps de QUICK normal.

B - Protocole suivi - L'expression des résultats -

Chaque produit est essayé à la dose standard de 100 mg/kg par voie orale. Le produit est mis en suspension dans l'huile d'olive. GORI et MOLTENI - 307 - (loc.cit.) ont démontré que l'absorption intestinale de ces coumarines en est grandement facilitée. Les animaux sont séparés en cage individuelle et reçoivent boisson et nourriture à volonté (granulé Pietrement). La température de la stalle est de $20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Les cinq lapins de chaque lot reçoivent ce traitement de charge, par gavage oral, après avoir subi un prélèvement veineux destiné à contrôler leur temps de QUICK de base. Dans les quatre jours suivants, le taux de prothrombine de chaque animal est déterminé, à la même heure.

Pour chaque série d'essai, un contrôle de la réactivité des animaux est conduit de la façon suivante : un lot de 5 lapins choisis au hasard dans le pool initial reçoit 2,5 mg/kg de Warfarine, dose suffisante pour faire baisser le taux de prothrombine de 3 animaux sur 5 entre 35 et 15 %. Il existe en effet une variation saisonnière du niveau des réponses des lapins aux antivitamines K. Elle semble au moins en partie sous la dépendance de la quantité de vitamine K ingérée dans la nourriture. Nous éliminons tout essai au cours duquel le lot "Warfarine" n'a pas donné la réponse attendue.

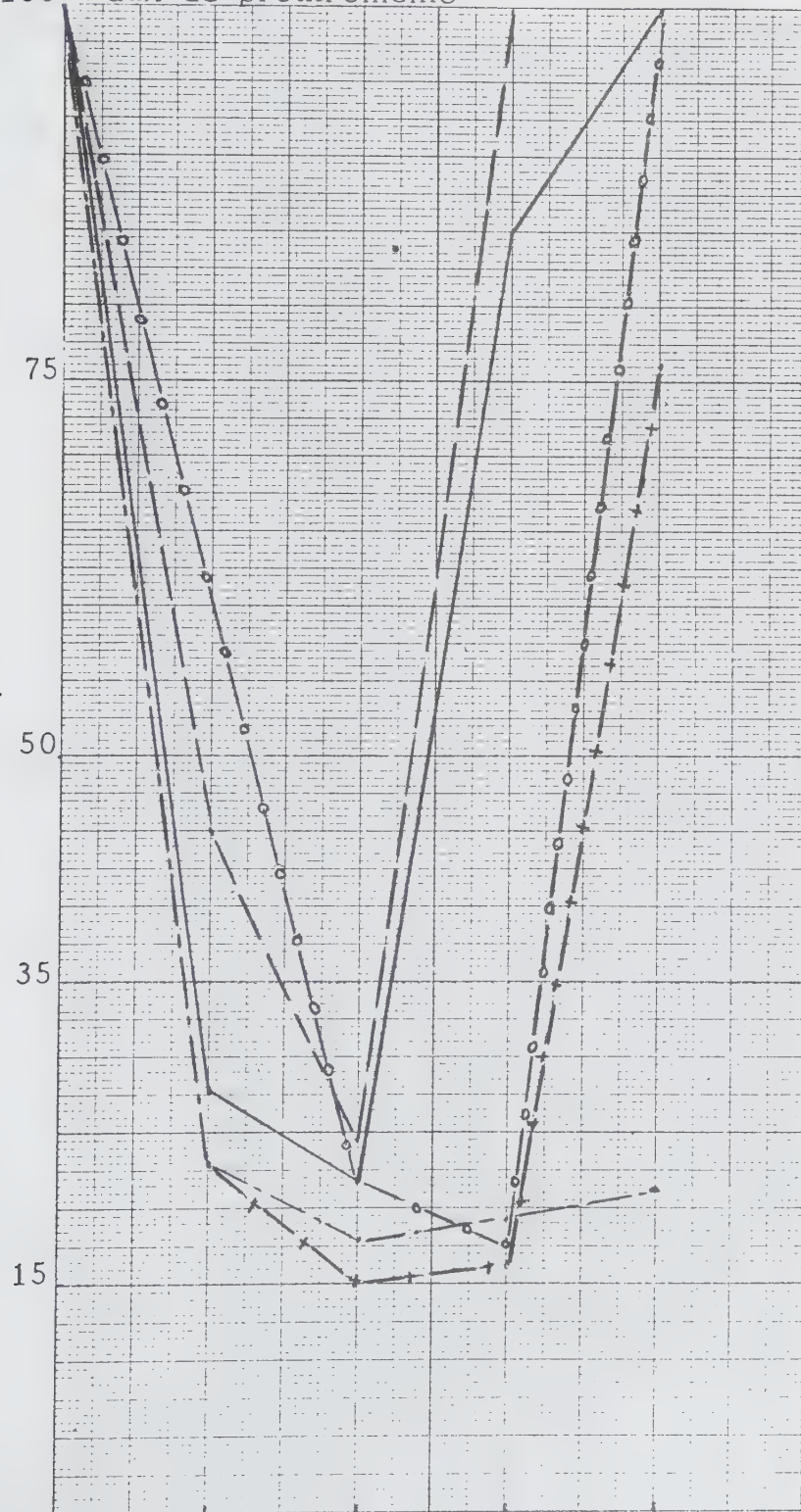
L'expression de nos résultats pour tous les produits essayés dans ce travail tient compte des mêmes critères. La transformation des temps de QUICK en taux de prothrombine permet de définir la réponse sur quatre jours à une dose standard de charge pour chaque lapin. Lorsque 3 au moins des 5 lapins du lot ont un taux de prothrombine descendu pendant la période d'examen, au-dessous de 35 %, le produit est classé comme ayant donné une réponse positive, et dans le cas contraire, la réponse biologique est classée comme négative.

A titre d'exemple, voici, selon la méthode décrite, un type de réponse positive (produit n° 42), un type de réponse négative (produit n° 45) et la réponse d'un lot de lapins à 2,5 mg/kg per os de Warfarine. (Graphiques n° 6, 7 et 8).

Graphique n° 6

Réponse positive de cinq lapins à une drogue efficace

100 Taux de prothrombine



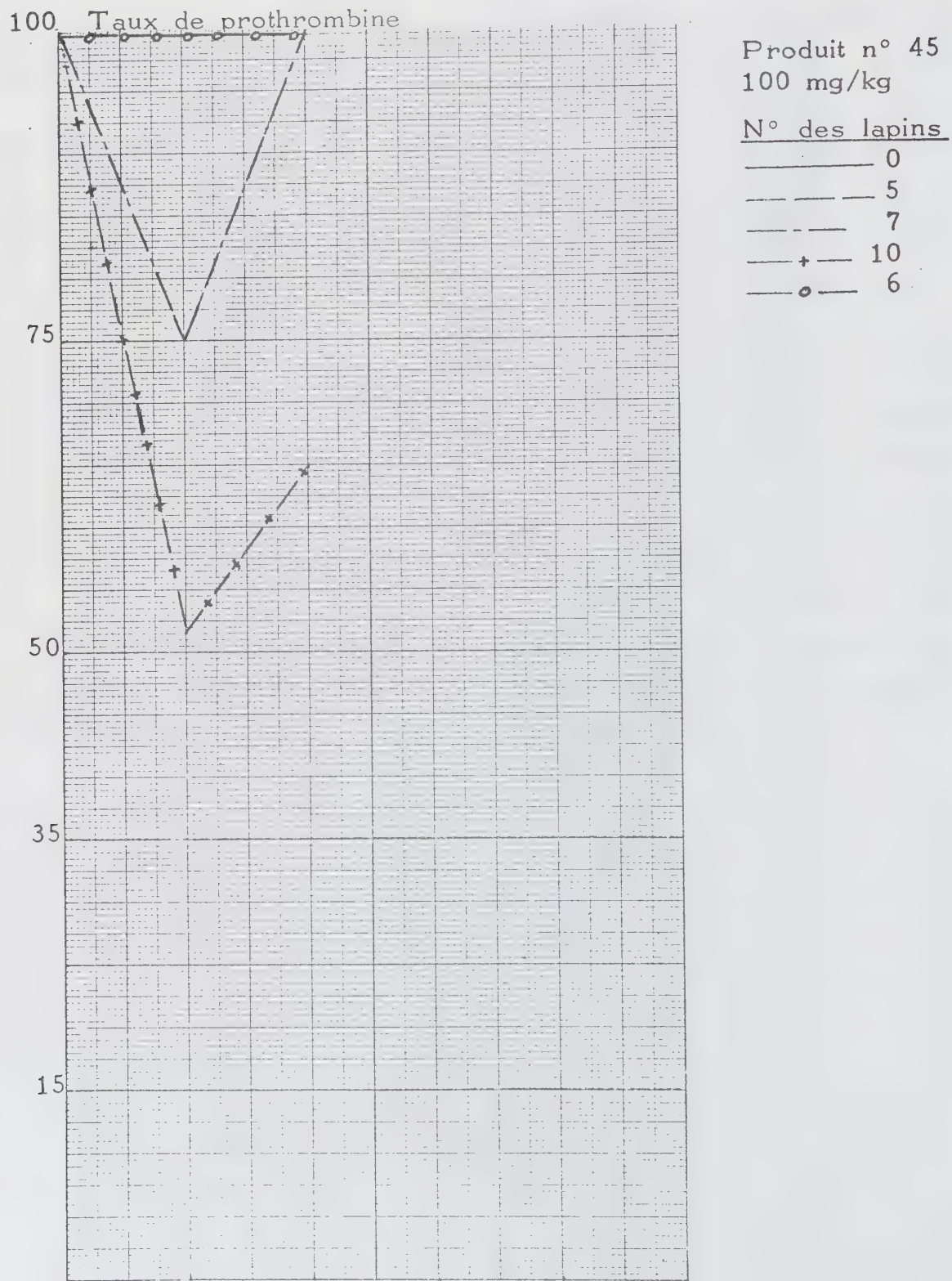
Produit n° 42
100 mg/kg

N° des lapins

— 4
- - 10
- · - 16
+ + 9
o o 17

Graphique n° 7.

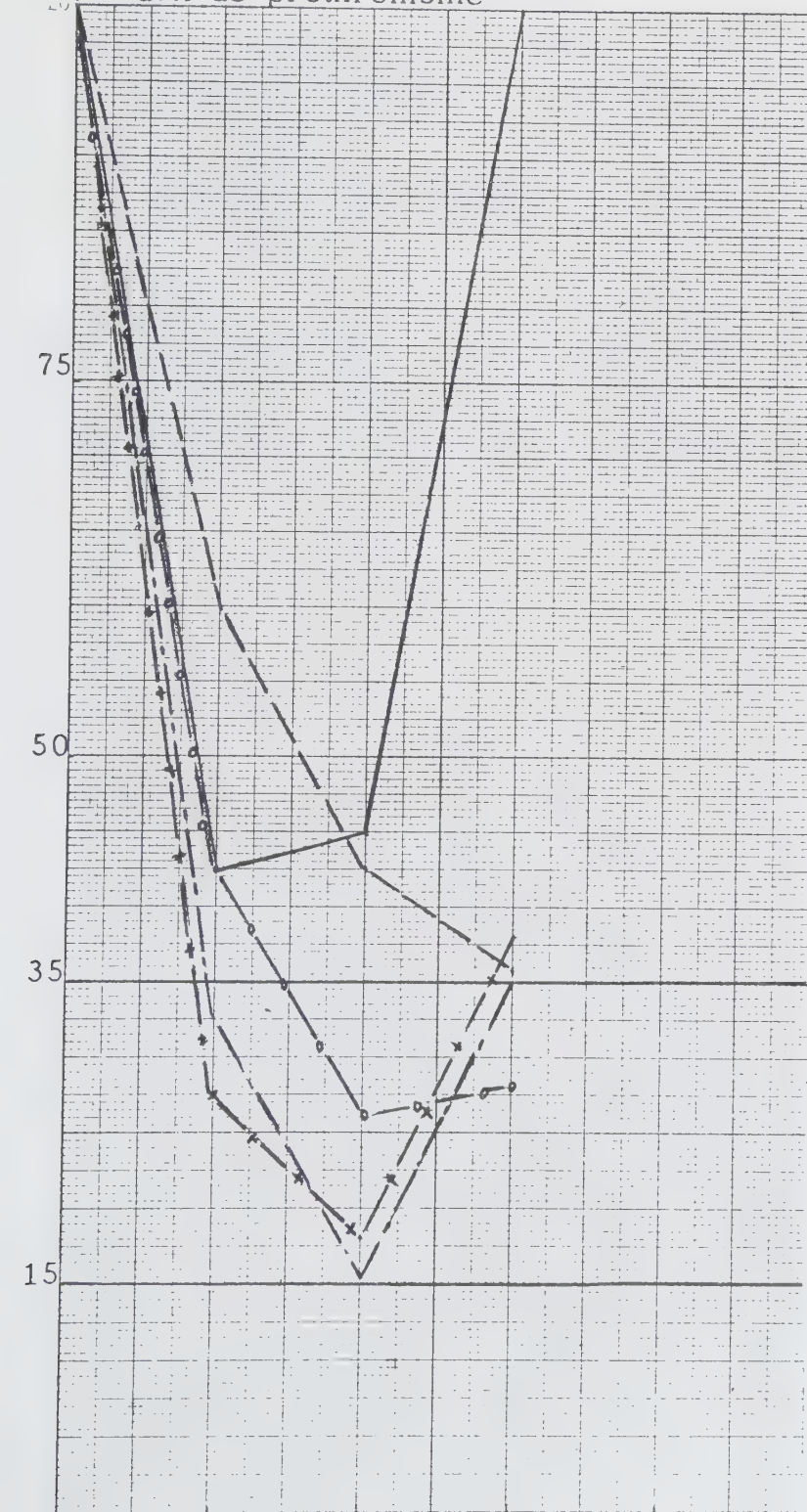
Réponse négative de cinq lapins à une drogue inefficace



Graphique n° 8

Réponse de cinq lapins à 2,5 mg/kg P.O. de Warfarine

100. Taux de prothrombine



Warfarine
2,5 mg/kg

N° des lapins

- 1
- - - 14
- . - 8
- + - 3
- o - 18

Nous exprimerons donc les réponses de la façon suivante dans les tableaux de résultats :

- résultat positif expérimental	+
- résultat négatif expérimental	o
- résultat positif d'après les données de la littérature	oui
- résultat négatif d'après les données de la littérature	non

Dans les deux derniers cas, nous n'aurons pu préciser la réponse personnellement par manque de produit et nous nous référerons aux données bibliographiques figurant au Premier Chapitre (paragraphe M).

2 - MESURE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

A - Etablissement d'une DL 50 approchée per os -

Nous exposerons ci-dessous les raisons qui nous obligent à définir l'activité anti-inflammatoire des produits loin de la zone toxique. Pour définir celle-ci, nous déterminons la dose léthale 50 approchée sur la souris pour chaque produit. Nous choisissons la souris albinos RAP, de sexe mâle, pesant 20 à 25 grammes. Les animaux habitués aux conditions de stabulation de notre laboratoire (ambiance à $23^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, eau de boisson et croquettes UAR à volonté) sont disposés dans des cages à litière par lots de cinq.

Ils sont mis à jeun 5 heures avant l'essai. Le produit est ajouté à une solution gommeuse facilitant la mise en suspension des produits insolubles dans de si petits volumes (soluté de gomme arabique à 100 g par litre d'eau ordinaire). Les animaux reçoivent par intubation stomacale, 0,2 ml de suspension pour 10 g de poids corporel. La mortalité est relevée dans les 48 heures. Nous donnons une posologie standard de 3.200 - 1.600 - 800 - 400 - 200 - 100 et 50 mg/kg à des lots de cinq animaux. Nous notons le lot où se produit trois morts sur cinq, ou nous définissons la moyenne entre 0 et 100 % de morts, ce qui nous permet de définir une dose léthale 50 approchée, comme la mesure la plus précise et la plus rapide de la toxicité, selon VALETTE (1959) - 326 - et CHEYMOL, BOISSIER et LECHAT (1961) - 327 -. Cependant, nous ne dépassons pas la dose de 3.200 mg/kg ; au-delà, le volume liquide à ingérer n'est pas compatible avec les dispositions anatomiques de l'animal.

B - Mesure du pouvoir antiphlogistique -

/ Les méthodes décrites /

Il existe une grande variété de modèles expérimentaux. Tous les auteurs sont d'accord sur la nécessité d'un triage pharmacologique basé sur l'emploi de plusieurs méthodes. En effet, les mécanismes de production de l'œdème diffèrent avec le choix de l'agent phlogistique, comme l'a bien précisé ROSKAM (1959) - 328 -. Le premier stade de l'inflammation est un œdème, le second une colonisation leucocytaire, le dernier un envahissement fibroblastique cicatriciel. Nous nous sommes cantonnés aux méthodes relevant du premier stade, seules susceptibles d'une grande cadence de travail, facilement accessibles, et donnant des résultats positifs avec les anti-inflammatoires ayant reçu une consécration clinique.

Les œdèmes peuvent être déclenchés par des moyens chimiques et par des moyens physiques.

Oedèmes d'origine chimique :

Les œdèmes généralisés peuvent être produits par injection de dextran : COHEN et coll. (1955) - 329 - COURVOISIER et coll. (1958) - 330 - LECOMTE et coll. (1959) - 331 -.

Mais ils se prêtent mal à une mesure précise de l'effet protecteur des drogues. De plus, ils sont sensibles aux antihistaminiques et aux inhibiteurs de la sérotonine. Nous préférons un effet inflammatoire localisé. Les auteurs utilisent habituellement deux espèces : le rat et le cobaye. L'anesthésie générale est parfois préconisée, permettant une étude continue de l'évolution de l'œdème : DOMENJOZ (1954) - 332 -. Nous avons préféré l'emploi d'animaux vigiles, ce qui élimine l'influence de

La patte postérieure du rat se prête bien au déclenchement d'un œdème local par injection de substances irritantes sous la surface plantaire. Les substances phlogistiques injectées dans ces conditions sont variées :

Formol au 1/10e :

FINNEY et SOMERS (1958) - 333 -
DUCHENE MARULLAZ (1962) - 334 -
VAN CAUWENBERGHE (1959) - 335 -
DOMENJOZ - 332 - (loc.cit.), (1960) - 336 -
KADATZ (1957) - 337 -
COHEN et GOT (1961) - 338 -

Ovalbumine :

DOMENJOZ - 332 - (loc.cit.)
KADATZ - 337 - (loc.cit.)
WILHELM (1952) - 339 -
JANBON (1961) - 340 -

Dextran :

DOMENJOZ - 340 - (loc.cit.)
KADATZ - 337 - (loc.cit.)

Sérotonine :

DOMENJOZ - 336 - (loc.cit.)
THEOBALD (1958) - 341 -
VAN CAUWENBERGHE - 335 - (loc.cit.)
MORS DORF (1959) - 342 -

Kaolin :

GARCET (1961) - 343 -
COHEN - 338 - (loc.cit.)

Levure de bière :

RANDALL (1957) - 344 -

GILFOIL (1963) - 345 -

Histamine :

VAN CAUWENBERGHE - 335 - (loc.cit.)

Carragénine :

WINTER (1962) - 346 -.

Le formol, puissant agent inflammatoire, est très irritant pour les tissus. L'ovalbumine donne des œdèmes plus dispersés. Ces deux agents doivent leur effet, au moins en partie, à une libération d'histamine ou de sérotonine tissulaire. Tout composé doué d'effet antisérotonine ou antihistaminique sera défini à tort comme un anti-inflammatoire. Beaucoup d'autres agents sont plus ou moins dans ce cas : le dextran, la levure de bière et bien entendu la sérotonine et l'histamine.

La carragénine est un polymère d'ester sulfurique du galactose, extrait des algues. Elle fut utilisée pour la première fois par WINTER - 346 - (loc.cit.). Selon cet auteur, elle ne présente pas les inconvénients des médiateurs précédents. L'œdème obtenu ne doit rien à l'histamine ni à la sérotonine. Il est maximal et régulièrement bien supporté. Les drogues antirhumatismales sont efficaces à dose faible : par exemple la phénylbutazone et les corticoïdes. Ces derniers agissent sans traitement prolongé des animaux, comme il était nécessaire jusqu'alors avec tous les autres agents phlogistiques. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi la carragénine comme agent d'inflammation locale de l'aponévrose plantaire du rat.

La mesure de l'œdème est conduite différemment selon les auteurs :

- calibrage de l'œdème avec des anneaux de diamètre variable (travail fastidieux),
- pesée des pattes après section sous anesthésie selon GARCET - 343 - (loc.cit.),
- mesure pléthysmographique du volume de la patte selon CHEVILLARD (1952) - 347 -, méthode que nous avons retenue.

Oedèmes d'origine physique :

La méthode retenue ci-dessus utilise le rat et un agent chimique d'irritation. Nous choisissons une méthode complémentaire sur une autre espèce animale, avec un autre agent phlogistique et un autre type de mesure. Il s'agit de l'érythème aux ultra-violets sur le cobaye, tel que WILHELM - 339 - (loc.cit.), KADATZ - 337 - (loc.cit.), WINDER, WAX et coll. (1963) - 348 - l'ont décrit.

Au total, le triage pharmacologique par la méthode de l'érythème aux ultra-violets est très sévère. Seuls les anti-inflammatoires ayant reçu une sanction thérapeutique indiscutable sont actifs sur ce modèle : aspirine, phénylbutazone. Comme nous le verrons plus loin, ce modèle peut être employé pour l'étude des drogues actives en pommade sur les téguments.

Le test à la carragénine donne aussi des résultats positifs avec des substances agissant à d'autres stades plus tardifs (corticoïdes). Nous pourrions ainsi détecter les produits doués d'un tel effet. Cependant cette méthode est très sensible, nous pourrions même dire trop optimiste : tout produit agissant faiblement dans cet essai et seulement sur celui-là, n'est pas doué d'un pouvoir anti-inflammatoire suffisant.

/ Description des deux méthodes retenues /

a) Oedème plantaire du rat à la carragénine :

C'est à peu près la technique originale de WINTER - 346 - (loc.cit.). Nous séparons des lots de 10 rats mâles Wistar, jeunes, pesant de 120 à 160 g. Ces animaux sont maintenus dans des conditions standard de stabulation : température $23^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, eau de boisson et croquettes d'aliment composé UAR à colonté. Nous injectons, sous la peau de la surface plantaire d'une patte arrière, 0,05 ml d'une suspension à 1 % de carragénine dans le sérum physiologique. Toutes les carragénines du commerce ne conviennent pas. Nous avons uniquement utilisé la Gélozone Whiffen ST 1. Elle nous a semblé donner plus régulièrement une enflure maximale. Le volume de la patte est mesuré avant et trois heures après cette injection, en plongeant le tarse de l'animal jusqu'à un repère constant (malléole externe) dans le pléthysmographe de CHEVILLARD. Le lot d'animaux traités reçoit le produit à essayer par intubation stomacale.

Les doses sont mises en suspension dans une solution aqueuse de gomme arabique à 10 % et données à raison de 1 ml pour 100 g de poids corporel. Une part est donnée 3 heures avant déclenchement de l'œdème, l'autre part est complétée à 5 ml par de l'eau ordinaire et donnée seulement 1 heure avant. Comme le propose WINTER, ce complément d'eau permet de maintenir l'hydratation normale des animaux. Le lot témoin subit les mêmes manipulations avec la solution gommeuse seule. Chaque essai comporte un lot "étalon" subissant un traitement parallèle avec la phénylbutazone.

Nous donnons (3 h puis 1 h avant l'essai) deux fois 1/15 de la dose léthale 50 souris per os pour les produits inconnus et pour la phénylbutazone, sans jamais dépasser 300 mg/kg, les résultats obtenus au-delà de cette dose nous paraissant sans intérêt pharmacologique. Cette précaution du renouvellement de la charge médicamenteuse évite de conclure négativement pour des produits ayant des rythmes de détoxication très variés.

Dans cet essai, les doses sont suffisamment faibles pour que des phénomènes toxiques n'interfèrent pas avec la mesure de l'œdème, comme l'a bien vu GARCET - 343 - (loc. cit.). Dans un stade préagonique, les rats en collapsus périphérique ne développent pas d'œdème plantaire : on croit alors à un résultat positif. C'est la crainte de cet écueil qui nous a obligés à conduire ce triage en fonction de la dose léthale 50 approchée de chaque composé inconnu,

et partant, à établir cette valeur pour tous les produits cités dans cette étude. Dans le cas de l'étalon, la phénylbutazone ayant dans notre laboratoire et dans ces conditions une DL50 de 600 mg/kg, nous administrons deux fois 40 mg/kg du produit.

Dans nos essais, l'activité anticoagulante éventuelle des drogues n'est pas en cause en raison du court laps de temps s'écoulant entre la première ingestion de la drogue et la mesure de l'œdème (6 heures).

Ultérieurement, nous avons employé l'ovalbumine comme agent phlogistique, à raison de 0,1 ml d'une solution saline de blanc d'œuf à 10 %. L'œdème était mesuré, toujours par pléthysmographie, deux heures après l'injection. Les anti-inflammatoires donnent alors une réponse inhibitrice valable au 1/8 de la DL 50 souris per os : par exemple, 150 mg/kg d'aspirine donnés deux fois de suite trois heures et une heure avant l'essai.

Voici les résultats comparés des trois méthodes :

- Formol
- Ovalbumine
- Carragénine.

La souche de rats n'a pas varié pendant tous ces essais qui s'étendent sur plusieurs mois. Il s'agit de 7 étalonnages de l'œdème au formol avec le pourcentage d'augmentation du volume des pattes du lot " témoin formol " et du lot " formol + phénylbutazone ". Il en est de même pour huit

essais avec l'œdème à l'ovalbumine, l'étalon étant chaque fois l'aspirine. Enfin, les mêmes paramètres sont donnés pour 48 essais d'œdème à la carragénine. Les valeurs des pourcentages moyens d'œdèmes témoins et d'inhibition par l'étalon sont affectées de leur coefficient de dispersion (erreur sur la moyenne).

Tableau 5

Diverses réponses tissulaires du rat à trois agents phlogistiques
Inhibition par l'aspirine et la phénylbutazone

Nature de l'œdème	Pourcentage d'augmentation de l'œdème témoin			Substance étalon			Pourcentage d'inhibition par l'étalon		
	Nbre de mesures sur 10 rats	% moyen d'augmentation	Erreur sur la moyenne	Nature	Dose	Rythme de traitement	Nbre de mesures sur 10 rats	% moyen d'inhibition	Erreur sur la moyenne
Œdème plantaire au formol	7	52,1 %	± 3,2	Phénylbutazone	1/3 DL50 souris PO = 200 mg/kg	21h et 1h avant l'œdème	7	41 %	± 1,3
Œdème plantaire à l'ovalbumine	8	58,2 %	± 3,1	Aspirine	1/8 DL50 souris PO = 150mg/kg	3h et 1 h avant l'œdème	8	40,6 %	± 1,9
Œdème plantaire à la carragénine	48	64,9 %	± 1,8	Phénylbutazone	1/15 DL50 souris PO = 40mg/kg	3h et 1h avant l'œdème	48	46 %	± 1,55

On voit sur ce tableau, que l'œdème témoin est, en moyenne, plus élevé et plus groupé avec la carragénine qu'avec les autres agents phlogistiques. L'inhibition étalon est aussi plus importante, bien groupée et surtout obtenue avec une dose beaucoup plus faible que dans les deux autres méthodes.

b) Erythème aux ultra-violets sur le cobaye :

Des cobayes albinos pesant au moins 300 g sont épilés très soigneusement d'un côté de la colonne vertébrale (tondeuse puis épilatoire). Quatre heures après, les animaux sont prêts pour l'essai. Le choix de l'épilatoire est important. Certaines préparations irritantes laissent la peau rougeâtre, même après quatre heures de repos, ce qui fausse l'appréciation de l'érythème. Les animaux sont munis d'un mantelet percé de trois trous d'un diamètre de 1 cm. Chaque lot de 8 cobayes subit une irradiation témoin, en contention ventrale à 30 cm d'une lampe U.V. de 400 W (Marque Verre et Quartz). L'exposition dure 30 minutes. Deux heures après, l'érythème est maximum et bien visible, il est localisé en trois surfaces rondes de 1 cm environ. Cette irradiation étalon a été précédée, une heure avant, d'un traitement par gavage oral d'excipient gommeux (1 ml pour 100 g d'une solution aqueuse de gomme arabique à 10 %). Le lendemain, les mêmes animaux subissent une seconde irradiation de l'autre côté de la colonne vertébrale, le produit à tester étant donné dans le même excipient, au 1/5 de la DL 50 souris per os, là encore sans dépasser 300 mg/kg. Notre étalon est cette fois l'aspirine, à 240 mg/kg. Nous n'avons pu donner moins de produit actif. Il nous a donc fallu

maintenir en observation les animaux après l'essai, afin d'éliminer tout résultat s'accompagnant de mortalité chez les cobayes dans les jours suivant l'expérience.

Nous vérifions régulièrement l'activité de l'étalon aspirine sur un lot de 8 animaux, toutes les semaines par exemple lors d'essais intensifs. Là encore, l'effet anticoagulant éventuel de certaines coumarines ne peut gêner (lecture de l'érythème 3 heures 30 après ingestion des drogues).

/ Expression des résultats /

Oedème à la carragénine -

L'étalon étant coté comme égal à 100, l'activité des produits s'exprime en pourcentage de l'activité de la phénylbutazone. Tout produit ayant un coefficient supérieur ou égal à 50 peut être considéré comme doué d'une certaine efficacité.

Erythème aux U.V. -

Nous apprécions l'érythème de la façon suivante :

- Aucun érythème	0
- Faible rougeur sur une des trois plages	5
- Erythème mal délimité sur les trois plages	10
- Erythème intermédiaire	15
- Erythème maximum sur les trois plages	20

Plusieurs tests en double aveugle ont permis de vérifier qu'il est possible d'apprécier valablement les nuances. Normalement, les animaux non protégés sont cotés 20, ce qui, pour les huit cobayes, donne une somme de 160 : soit N cette valeur "de base".

Après traitement par un produit protecteur, la valeur de l'érythème dans le lot tombe à un nombre P.

Le coefficient d'activité du produit ou indice U.V. est le rapport $\frac{N}{P}$.

Pour la phénylbutazone ou l'aspirine au 1/5 de la DL 50 per os, ce coefficient est habituellement de : $\frac{160}{80} = 2$.

Tout produit inactif a un coefficient égal à 1. Nous pensons que le seuil d'activité se situe autour de 1,5. Il existe alors un retard déjà significatif de l'apparition de l'érythème.

En pratique, les deux méthodes étant complémentaires et les produits ayant été testés d'après les deux schémas (sauf exception par manque de substance), nous considérons comme probablement anti-inflammatoire au stade du triage ainsi défini, les drogues donnant à la fois un coefficient d'au moins 50 au test à la carragénine et un indice U.V. d'au moins 1,5.

III - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE COMPAREE DE
QUELQUES ANTICOAGULANTS CONNUS

Dans ce premier temps de notre travail, nous cherchons à savoir s'il existe des anti-inflammatoires dans les anticoagulants antivitaminiques K connus.

/ RESULTATS DE TRIAGE /

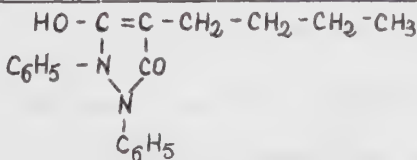
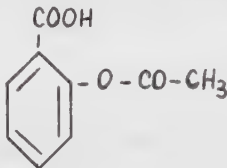
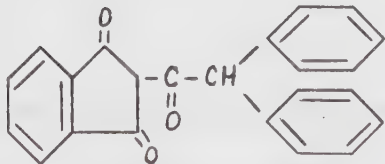
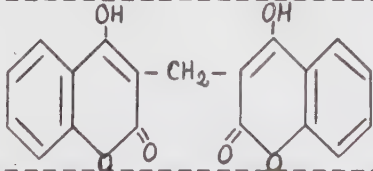
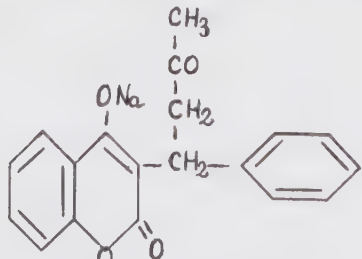
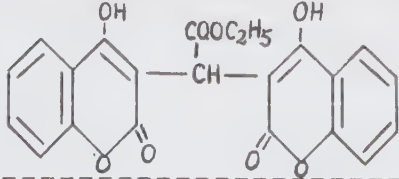
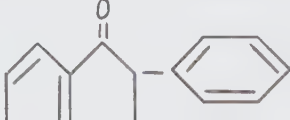
Nous utilisons les médicaments suivants, choisis dans les diverses classes précisées dans le premier chapitre.

- Diphacinone (acyl indane dione)
- Dicoumarol - Warfarine sodée - Biscoumacétate d'éthyl (hydroxy 4 coumarines)
- Phénindione (aryl indane dione).

Les résultats de triage sont condensés dans le tableau suivant :

Tableau 6

Recherche d'une activité anti-inflammatoire de divers anticoagulants
de type antivitamine K

Produit	Formule	DL 50 48 h en mg/kg P.O	Cedème à la carra- génine sur le rat	Nombre de rats par lot	Activité anti-inflam. PO après 2 intub. = chacune au 1/15 DL50 souris	Erythème aux U.V. sur le cobaye	Nombre de cobayes par lot	Activité anti-inflam. PO après 1 intub. = au 1/5DL 50 souris coéf. N/P
lon — ragénine : lbutazone:		600		<u>10</u>	<u>100</u>			
alon V. : irine		1.200				<u>8</u>	<u>2,5</u>	
pha- none		750		10	21	8	1	
cou- rol		232		10	0	8	0	
farine ée		374		10	34	8	0	
couma- te hyl		880		10	4	8	0	
nin- e		250		<u>10</u>	<u>88</u>	<u>8</u>	<u>2,6</u>	

Seule phénindione a une activité anti-inflammatoire voisine de la phénylbutazone et de l'aspirine. Warfarine sodée et diphacinone ont une activité décelable seulement sur l'œdème à la carragénine, mais largement inférieure aux normes que nous avons fixées. Les deux dicoumariniques : dicoumarol et biscoumacétate d'éthyl sont totalement inactifs.

/ RECHERCHE D'UNE RELATION DOSE-ACTION /

Dans l'essai précédent, phénindione apparaît douée d'une efficacité intéressante. Mais il s'agit d'une appréciation portée sur une seule dose forte. Pour tout produit actif, il existe une croissance de l'activité en fonction de la dose. La courbe ayant une allure exponentielle, nous avons comparé l'activité de phénindione et des deux étalons, dans les deux tests retenus, en exprimant la réponse en fonction du logarithme de la dose selon BURN (1952) - 349 -.

Dans le cas du test à la carragénine, la réponse est le pourcentage d'inhibition par rapport à l'enflure moyenne d'un lot témoin. Dans celui de l'érythème aux ultra-violets, la réponse pour chaque dose est le pourcentage de cobayes protégés, c'est-à-dire atteignant le coefficient $\frac{N}{P} = 2$.

/ Oedème à la carragénine /

Les doses et résultats sont condensés dans le tableau suivant :
(Tableau n° 7).

Tableau 7

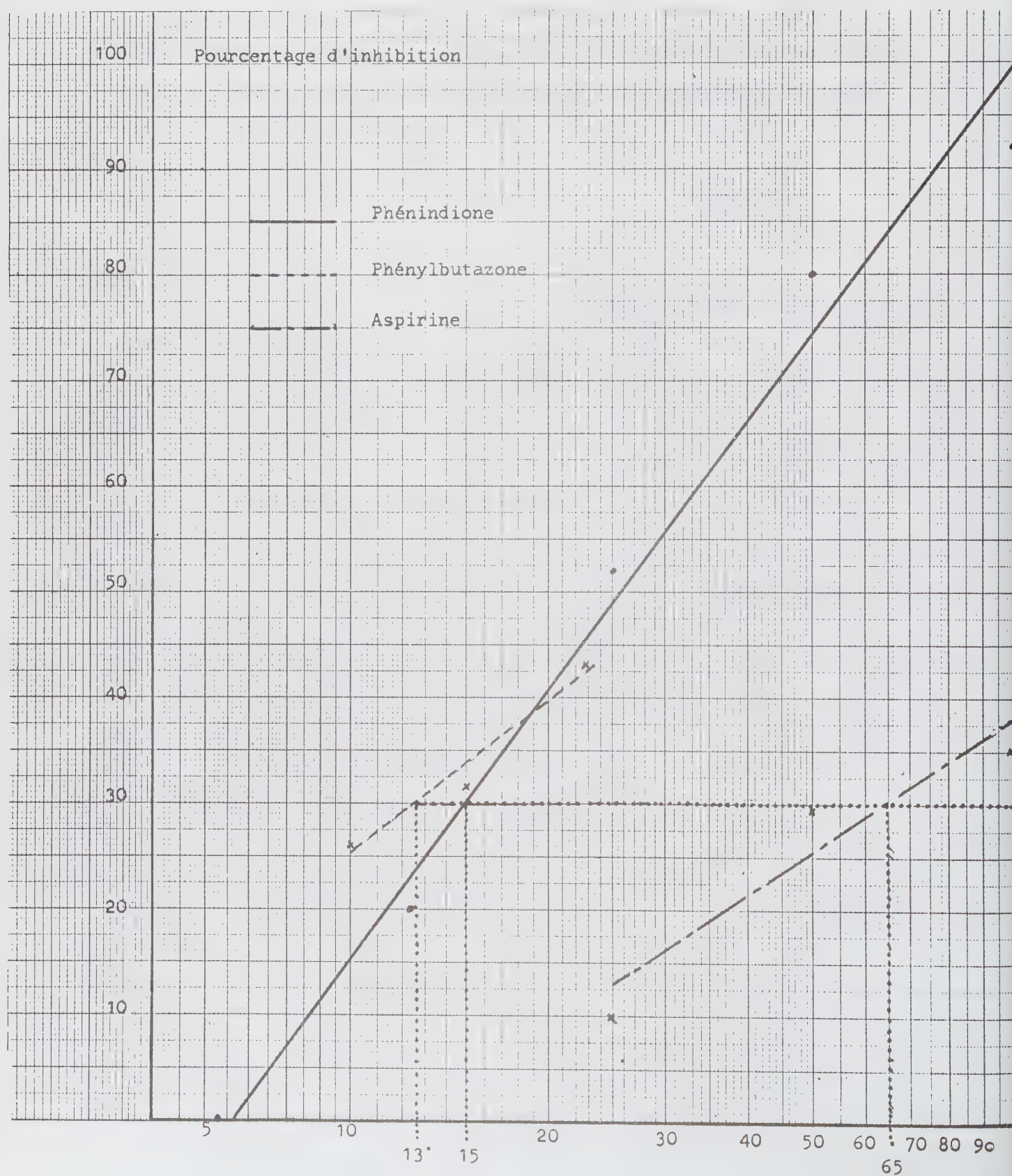
Action de diverses doses de phénindione, phénylbutazone et aspirine
dans l'œdème à la carragénine chez le rat

Lot	Nombre de rats par lot	Doses administrées 2 fois - 3 h et 1 h avant l'essai (en mg/kg)	Pourcentage d'inhibition par rapport à l'œdème témoin
Phénindione	10	6,25	0
Phénindione	10	12,50	20
Phénindione	10	25	52
Phénindione	10	50	82
Phénindione	10	100	91
Phénylbutazone	10	10	26
Phénylbutazone	10	15	32
Phénylbutazone	10	22,5	43
Aspirine	10	25	10
Aspirine	10	50	29
Aspirine	10	100	35

Graphiquement, sur un papier semi-logarithmique (pourcentage d'inhibition contre le logarithme des doses) nous obtenons les droites de régression suivantes pour phénindione et les trois étalons (graphique n° 9).

Graphique n° 9

Oedème à la carragénine - DA 30 P.O.



Nous avons déterminé graphiquement des niveaux d'activité comparables pour les trois produits. Nous choisissons la dose active 30 ou DA 30, dose capable d'inhiber de 30 % l'œdème maximal sur un lot de rats. Il est difficile, pour tous les produits, d'atteindre avec sécurité des niveaux d'inhibition situés aux environs de 50 %.

La DA 30 "carragénine" peut être fixée à :

- 13 mg/kg (donnés deux fois : 3 h et 1 h avant l'œdème) pour la phénylbutazone,
- 65 mg/kg (donnés dans les mêmes conditions) pour l'aspirine,
- 15 mg/kg (donnés dans les mêmes conditions) pour phénindione.

En conclusion, l'activité de phénindione est très importante d'après les résultats de ce test pharmacologique.

/ Erythème aux ultra-violets /

Le tableau suivant résume les résultats expérimentaux.
(Tableau 8).

Tableau 8

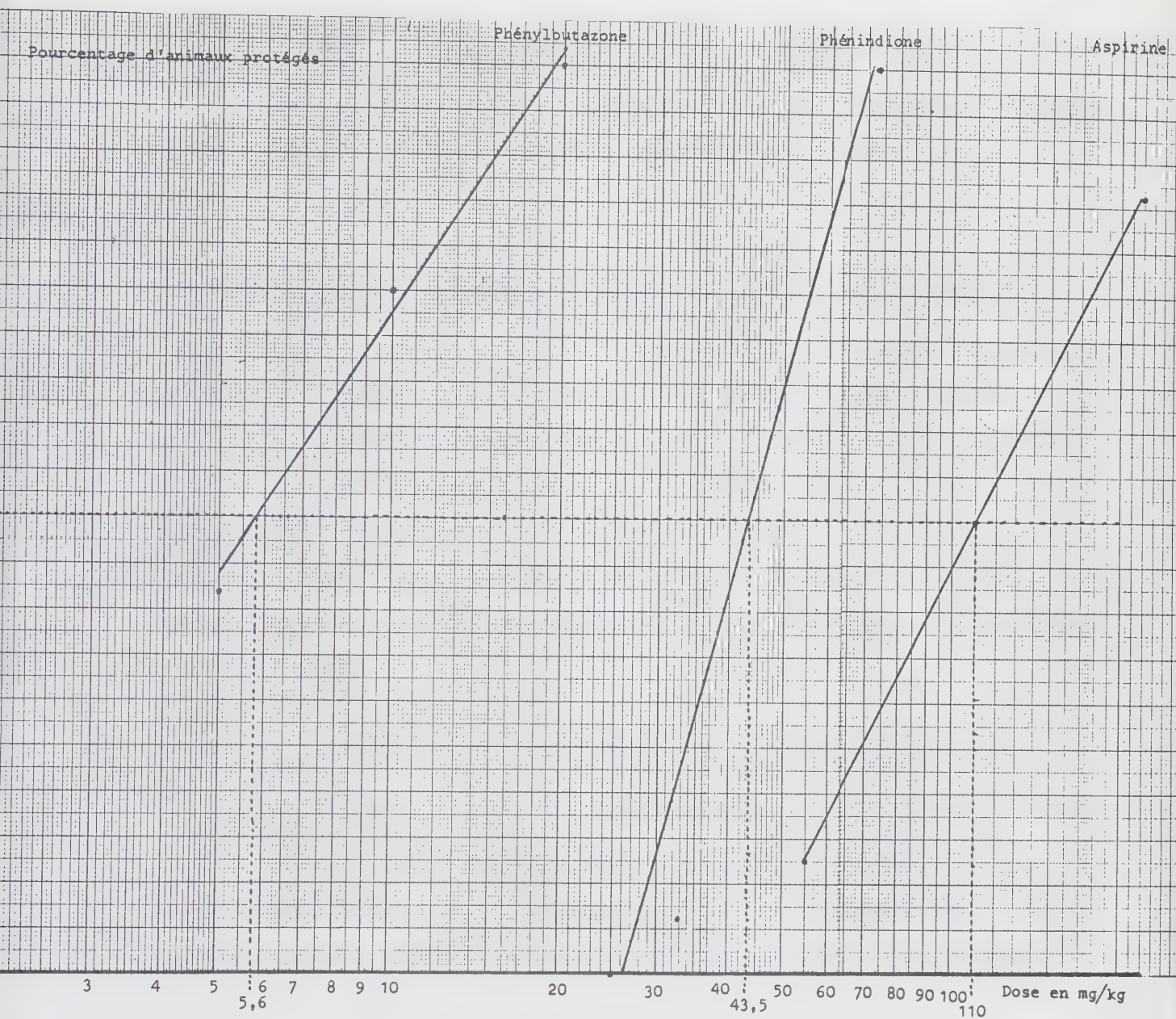
Erythème aux U.V. sur le cobaye
 Protection conférée par phénindione, phénylbutazone et aspirine
 à des doses croissantes

Lot	Nombre de cobayes par lot	Doses administrées 1 heure avant l'essai (en mg/kg)	Pourcentage d'animaux protégés dans chaque lot
Phénindione	8	32,5	12,5
Phénindione	8	48,7	62,5
Phénindione	8	73,1	100
Phénylbutazone	19	5	42
Phénylbutazone	16	10	75
Phénylbutazone	16	20	100
Aspirine	8	55	12,5
Aspirine	8	110	50
Aspirine	7	220	86

Nous établissons une dose efficace 50 (DE 50), dose capable d'inhiber la réaction inflammatoire, pour 50 % des animaux d'un lot, pour phénindione et les deux étalons. Ce mode d'expression plus pharmacologique est ici possible, chaque cobaye étant son propre témoin. Ces valeurs ressortent du graphique suivant (graphique n° 10).

Graphique n° 10

Erythème aux U.V. - DE 50 P.O.



- Aspirine	DE 50 = 110 mg/kg
- Phénylbutazone	DE 50 = 5,8 mg/kg
- Phénindione	DE 50 = 43,5 mg/kg

Là encore, la phénindione se situe entre les deux étalons reconnus. Il faut noter la puissance de la phénylbutazone, notion que la clinique a confirmée.

/ ETUDE COMPLEMENTAIRE DE LA PHENINDIONE /

La phénindione est donc douée d'une nette activité anti-inflammatoire, par voie orale. Nous rappelons que ce produit a été utilisé en clinique par voie cutanée, en pommade, dans le traitement des œdèmes phlébitiques. Pouvons-nous donner une base physiologique à cette indication thérapeutique ? L'activité de la phénindione étant particulièrement bien visible dans la protection contre l'œdème à la carragénine, existe-t-il une participation de l'axe hypophyse - surrénales à son efficacité ?

Essai de l'activité de la phénindione par voie externe -

Nous adoptons la technique de l'érythème aux ultra-violets sur le dos épilé du cobaye, après application in situ de la pommade. Les cobayes ne se lèchent pas mutuellement, ils n'absorbent donc pas le produit par voie orale, ce qui fausserait la mesure de l'activité locale. Les animaux sont leur propre témoin : 24 heures avant l'essai, l'excipient de la pommade est passé sur un côté de la ligne vertébrale, dans les mêmes conditions que pour la pommade elle-même : volume, durée du massage et de l'irradiation. MARCY et coll. (1960) - 350 - ont décrit l'importance de l'effet écran de certains médicaments - dont la phénylbutazone -. Ce test pourrait donc

conduire à confondre un effet anti-solaire et un effet anti-inflammatoire. Nous avons appliqué une pommade contenant 5 % d'acide anthranilique, puissant absorbeur d'ultra-violets, sur le dos des cobayes d'un autre lot. Aucune protection n'a été observée dans les conditions de notre essai : 2 heures après l'arrêt de l'irradiation, l'érythème était maximum chez tous les animaux. La puissance de l'irradiation permet sans doute de différencier les deux effets.

En bref, sur des lots homogènes de 8 à 10 cobayes albinos fraîchement épilés, nous avons appliqué 1 gramme de l'excipient choisi dans la région dorso-lombaire, d'un côté de la ligne vertébrale. Nous avons massé pendant 2 minutes jusqu'à absorption maximum. Les animaux ont été laissés au repos 30 minutes, puis irradiés pendant 30 minutes, à 45 cm d'un générateur U.V. de 400 watts. 2 heures après l'arrêt de l'irradiation, on notait l'intensité de l'érythème par cotation arbitraire, avec les précautions d'usage (plusieurs lecteurs entraînés, lumière d'ambiance constante).

Nous utilisons la même cotation que précédemment : érythème maximum = 20 par animal. Nous obtenons une somme de réponses inflammatoires pour le lot de cobayes quand il est traité avec l'excipient (N) puis avec la pommade active (P).

Nous appelons indice U.V. le rapport $\frac{N}{P}$. Tout indice inférieur à 2 est considéré comme non significatif.

Les résultats sont condensés dans le tableau suivant (tableau 9). Nous donnons la nature des excipients employés ; elle a une grande importance dans la vitesse d'absorption cutanée, et partant dans la valeur de la réponse.

Tableau 9

Activité anti-inflammatoire externe comparée de
phénindione et de phénylbutazone

Produit	Concentration	Excipient	Nombre de cobayes testés	Coefficient de protection N/P
Phénindione	5 %	Lanette N* Cétiol V* Alcool cétylique Eau distillée	8	$\frac{160}{55} = 2,9$
Phénylbutazone	5 %	même excipient	16	$\frac{325}{100} = 3,25$
Acide anthranilique	5 %	même excipient	8	$\frac{115}{110} = 1,04$

* Lanette N : mélange de 10 % de cétostéarylsulfate de sodium et de 90 % d'alcool cétostéarylique (agents émulsionnants).

* Cétiol V : décyl ester de l'acide oléique.

Dans cet excipient à phase continue aqueuse (celui employé par le fabricant d'après les renseignements communiqués), phénindione possède une bonne activité anti-inflammatoire, comparable à celle obtenue avec la même concentration de phénylbutazone dans le même excipient.

Contribution à l'étude du mode d'action de l'activité de la phénindione

Nous cherchons à préciser le mode d'action anti-inflammatoire de la phénindione qui fait figure d'exception dans la série des antivitamines K. Très souvent, les anti-inflammatoires agissent en stimulant l'axe hypophyse-surrénales, ce qui conduit à une augmentation de la sécrétion des gluco-corticoïdes anti-inflammatoires. Pour préciser ce mode d'action du produit, nous cherchons la diminution du pouvoir antiphlogistique de la phénindione sur des animaux surrénalectomisés.

Les rats mâles de 120 g subissent une surrénalectomie bilatérale et reçoivent, après ablation, 0,25 mg par rat de désoxycorticostérone, par voie sous-cutanée. Le lendemain, on déclenche un œdème de la patte arrière par injection d'une suspension de carragénine, selon la technique décrite plus haut.

L'emploi des animaux, moins de 50 heures après surrénalectomie, permet d'éviter l'incidence des suppléances dues aux surrénales accessoires dont le relais est très rapide chez ces jeunes rats, comme l'a bien montré DOMENJOZ - 332 - (loc.cit.).

Un lot de 10 rats non surrénalectomisés reçoit 1 ml pour 100 g P.O. de gomme arabique à 10 % (excipient, lot témoin). Un deuxième lot de 10 rats non surrénalectomisés reçoit deux fois 15 mg/kg de phénindione par voie orale dans l'excipient, 3 heures et 1 heure avant

l'œdème. Un troisième lot de 10 rats surrénalectomisés de 24 heures, reçoit l'excipient. Le dernier lot, surrénalectomisé, reçoit 15 mg/kg de phénindione P.O. dans l'excipient, 3 heures et 1 heure avant l'œdème.

Résultats :

Ils sont consignés dans le tableau suivant (tableau 10).

Tableau 10

Influence de la surrénalectomie sur la protection conférée au rat par la phénindione dans l'œdème à la carragénine

Lot	Nombre de rats par lot	Surré- nalec- tomie	Traitement P.O.	Pourcentage d'augmentation du volume de la patte	Pourcentage d'inhibition de l'œdème	Signification statistique T de Student seuil significatif
Témoins	10	non	excipient	96 %	X	
Phénindione sur rats normaux	10	non	15 mg/kg 2 fois	56 %	42 %	$P < 0,01$
Témoins	10	oui	excipient	65 %	X	
Phénindione sur rats surrénalectomisés.	10	oui	15 mg/kg 2 fois	50 %	23 %	$P > 0,05$

L'examen du tableau 10 montre que la protection conférée par phénindione à des rats normaux est hautement significative. Par contre, sur des rats surrénalectomisés, la drogue a une activité moyenne non significative, même au seuil de $P = 0,05$. La sécrétion corticosurrénalienne pourrait donc intervenir, au moins pour une certaine part, dans l'effet anti-inflammatoire de la phénindione.

IV - EXTENSION DE CES RECHERCHES D'ACTIVITE

ANTI-INFLAMMATOIRE A DES STRUCTURES CHIMIQUES VOISINES

Dans l'exposé des résultats suivants seront citées des molécules originales ou dont l'activité anti-inflammatoire n'a pas été décrite ou exploitée. Toutes ces substances ont été testées selon le protocole décrit au paragraphe II de ce chapitre. Il s'agit d'hétérocycles dérivés des pyrones, des aryl indane diones et des acyl indane diones, ces deux dernières pouvant être considérées comme des simplifications structurales des coumarines.

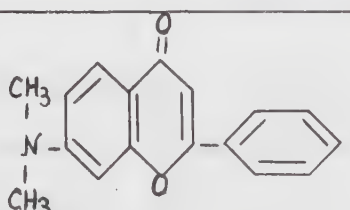
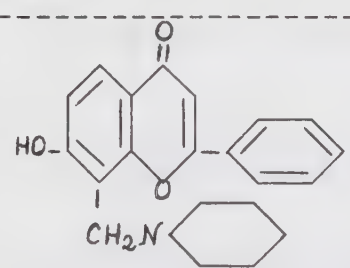
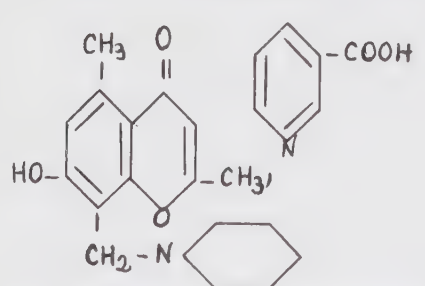
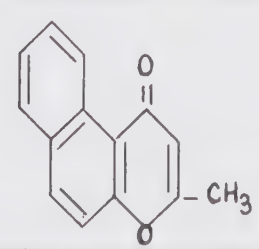
Nous groupons nos résultats par structure chimique afin de dégager plus facilement d'éventuelles relations structure / activité. Dans certains cas, vu le petit nombre des molécules disponibles examinées, le travail conserve un simple caractère de sondage.

/ A - DERIVES DES GAMMA PYRONES /

Il s'agit de l'essai de quelques flavones et chromones.
(tableau 11).

Tableau 11

Recherche d'un effet anti-inflammatoire de quelques dérivés des gamma pyrones

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
Flavones	1		> 3.200	non	1	54
	2		80	non	1	0
Chro- mones	3		300	non	1	29
	4		3.200	non	*	40

* quantité insuffisante de produit - test non exécuté.

Ces produits n'ont pas d'activité anticoagulante selon les données de la littérature, exposées dans le premier chapitre. On note une absence totale de protection contre l'érythème aux ultra-violets. La présence de chaînes azotées en 7 ou en 8 dans les deux noyaux n'est pas favorable à l'apparition d'une activité anti-inflammatoire. Nous n'avons pu disposer que de quelques représentants de ces gamma pyrones.

/ B - DERIVES DES ALPHA PYRONES /

1°) Dérivés autres que les hydroxy coumarines -

Nous examinons tout d'abord les dérivés de ce groupe ne faisant pas partie des hydroxy coumarines : alpha pyrones proprement dites et benzo alpha pyrones ou coumarines (tableau 12).

Tableau 12

Dérivés des alpha pyrones autres que les hydroxy coumarines

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
Alpha pyrones	5		3.200	non	1	plus de produit
	6		300	non	1	55
Benzo alpha pyrone ou coumarine	7	 (la coumarine)	350	non	1	21
	8		2.400	non	1,45	0

On note l'absence d'activité anticoagulante, en particulier dans les deux coumarines non pourvues d'un hydroxyle en 4.

L'activité anti-inflammatoire est nulle. L'alourdissement de la molécule coumarinique ne modifie pas ce résultat.

2°) Les hydroxy coumarines -

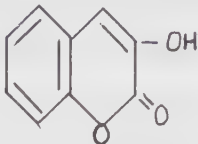
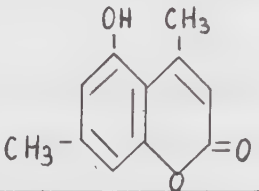
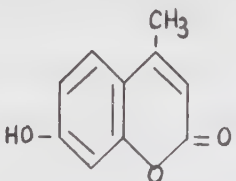
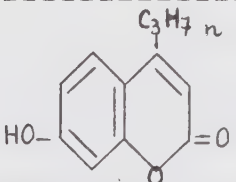
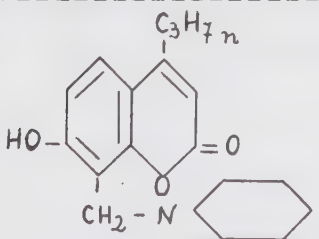
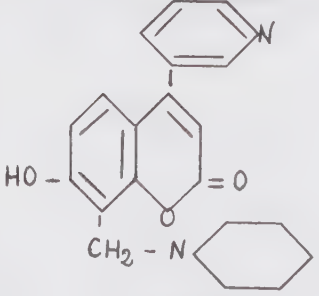
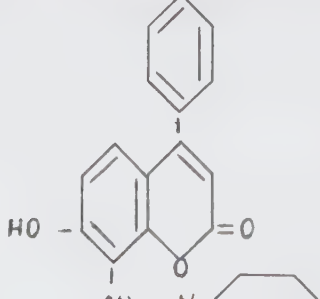
C'est pour nous le groupe des molécules les plus importantes. L'hydroxyle en position 4 commande l'effet anticoagulant. Les variations de position des hydroxyles sur les sommets modifient les caractères physico-chimiques des molécules : sur le noyau, l'hydroxyle a un caractère phénolique qu'il n'a pas sur la chaîne lactonique.

a) Hydroxy coumarines autres que les hydroxy 4 coumarines :

Nous regroupons de hydroxy 3, 5 et 7 coumarines n'ayant pu disposer de dérivés hydroxylés en 6 et en 8 (tableau 13).

Tableau 13

Dérivés des coumarines hydroxylées en 3, 5 et 7

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
Hydroxy- 3 cou- marine	9		1.800	non	1	0
	10		> 3.200	non	1	0
Hydroxy- 7 cou- marine	11		> 3.200	0	1	15
	12		> 3.200	non	1	37
	13		300	0	1	6
	14		400	non	1	0
	15		580	non	1	20

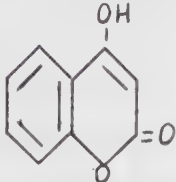
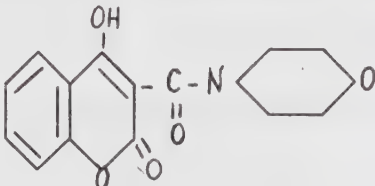
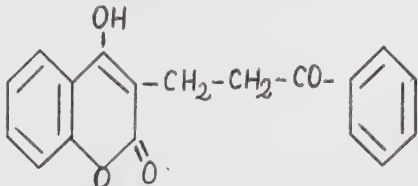
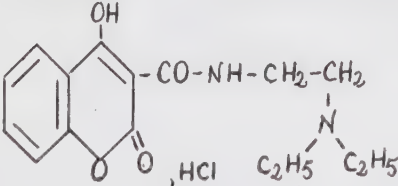
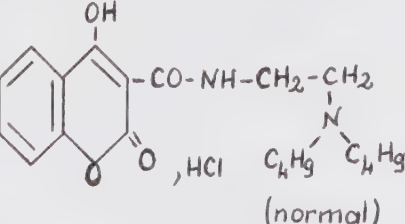
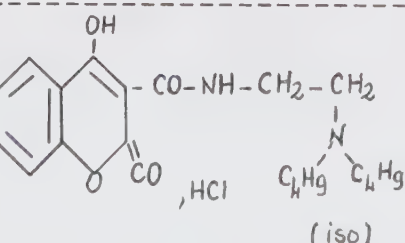
Aucun produit testé n'est anticoagulant sur le lapin. Nous avons vérifié personnellement la réponse des dérivés n° 11 et 13. Il n'y a pas d'activité anti-inflammatoire non plus. La charge du sommet n° 4 des hydroxy 7 coumarines a varié depuis le radical alkyl le plus simple jusqu'au noyau benzène, sans modifier les résultats. L'alourdissement de la molécule (en particulier par substitution du sommet n° 8) et le caractère basique plus accusé ne sont pas favorables.

b) Les hydroxy 4 coumarines :

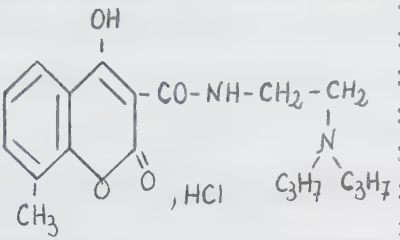
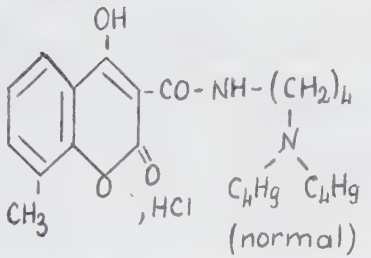
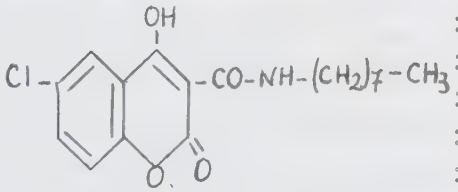
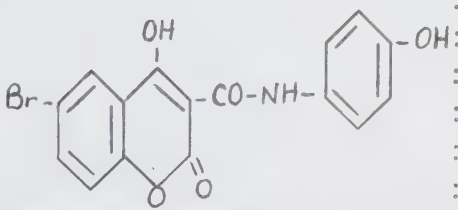
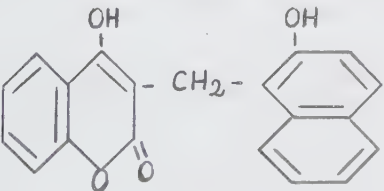
Les résultats expérimentaux sont réunis dans le tableau 14.

Tableau 14

Dérivés de l'hydroxy 4 coumarine

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
Aucune substi- tution	16		2.000	non	1	18
	17		> 3.000	non	1,1	0
	18		2.500	+	1,1	0
Une substi- tution en 3	19		523	0	1	27
	20		1.200	non	1	0
	21		> 3.200	non	1,1	90

Dérivés de l'hydroxy 4 coumarine
(suite)

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V	Test à la carragénine
	22		400	non	1,1	18
	23		400	non	1	21
	24		> 3.200	non	1	0
	25		> 3.200	0	1	14
	26		3.000	+	1	26

Les diverses substitutions ne font jamais apparaître un effet anti-inflammatoire. Même dans le cas de l'addition de deux radicaux butyl, dont on sait l'importance dans la phényl-butazone. L'halogénéation du noyau benzénique pour les dérivés 24 et 25 supprime toute activité anticoagulante (nous l'avons vérifié dans le cas du n° 25). Deux produits (n° 18 et 26) ont un effet antivitaminique K très net sur le lapin dans les conditions prévues dans notre essai. Aucune des deux structures n'est anti-inflammatoire. Ce résultat est à rapprocher de celui observé avec la warfarine, le bis-coumacétate d'éthyle et le dicoumarol (tous anticoagulants coumariniques exploités en clinique) au paragraphe III du présent chapitre (tableau n° 6).

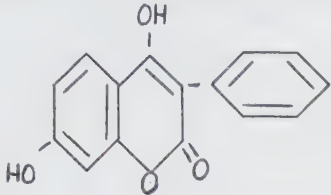
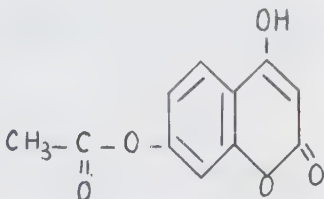
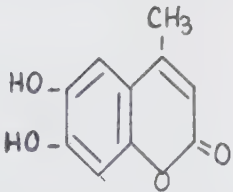
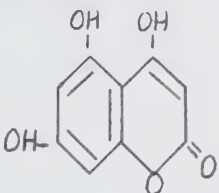
c) Les poly hydroxy coumarines :

Quelques dérivés sont essayés : parmi eux,

- deux 4, 7 di hydroxy coumarines
 - une 6, 7 di hydroxy coumarine
 - une 4, 5, 7 tri hydroxy coumarine
- (tableau 15).

Tableau 15

Activité de quelques polyhydroxy coumarines

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
hydro- 4,7 uma- ne	27		600	non	1	0
	28		>3.200	non	1	0
hydro- 6,7 uma- ne	29		3.200	non	1	0
trihy- droxy 5,7 uma- ne	30		>3.200	non	1	38

Nous ne trouvons pas d'anticoagulants pour des raisons structurales connues : en particulier la charge du noyau benzénique et l'absence de chaîne alkyl en 3. Les produits étudiés ne sont pas non plus doués d'effet anti-inflammatoire.

En conclusion, aucune des coumarines étudiées, même celles douées d'effet anticoagulant, n'est anti-inflammatoire.

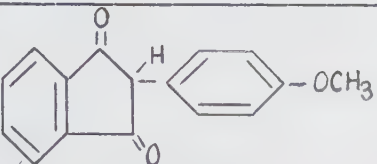
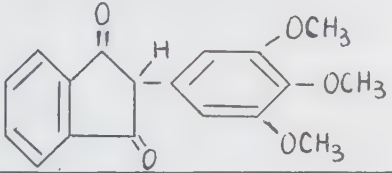
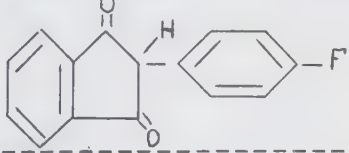
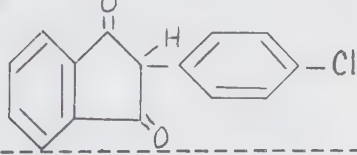
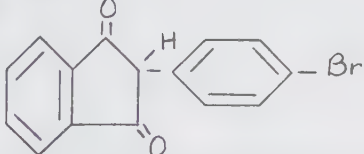
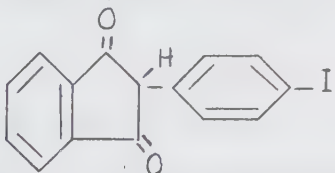
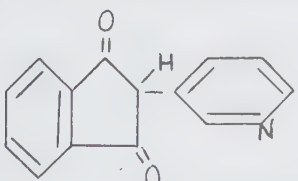
/ C - DERIVES DES ARYL INDANE DIONES /

Le tableau 16 donne nos résultats expérimentaux.

Tableau 16

Dérivés de l'indane dione

Les produits signalés par un astérisque ont été récemment proposés en thérapeutique, comme anticoagulants : corps n° 31, 34 et 35.

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
Indane-1,3-diones substituées sur le phényle 2 par : coxy	31		300	+	1,3	50
	32		800	0	1,3	33
	33		240	+	2,6	100
Indane-1,3-diones substituées sur le phényle 2 par : halogène	34		1.220	+	4	93
	35		200	+	2,6	55
	36		250	+	1,5	62
	37		>3.200	0	1	77

Para chloro phényl phtalimide

Il existe dans ce groupe de nombreuses substances dont nous avons vérifié l'activité anticoagulante. De nombreux dérivés montrent aussi un effet anti-inflammatoire.

Dans certains cas : n° 31 - 38 - 41 - 43, nous avons pu faire apparaître une forte réponse hypoprothrombinique en donnant 300 mg/kg P.O. aux lapins en expérience. Nous examinerons plus loin les conséquences de cette vérification expérimentale pour ces composés dont l'activité était faible à 100 mg/kg.

Nous avons pu successivement étudier l'influence des modifications structurales suivantes :

- Substitution du phényl en 2 par des radicaux "alcoxy" halogénés,
- Remplacement de ce radical arylique par un noyau pyridyl
- Alourdissement du noyau benzénique de l'indane
- Empêchement de l'apparition des forme tautomères dans la série.

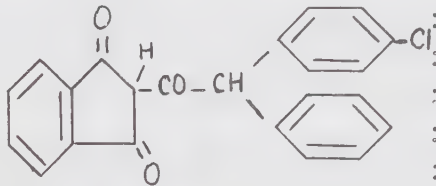
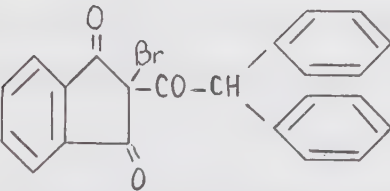
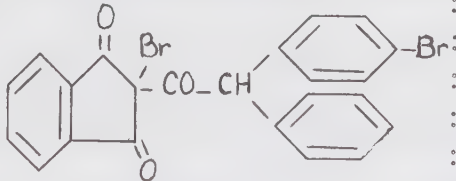
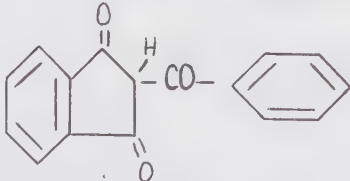
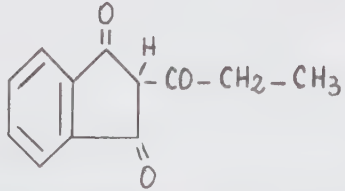
Le premier examen du tableau montre qu'il existe une liaison entre la présence de l'activité anti-inflammatoire et celle de l'activité anticoagulante.

/ D - LES ACYL INDANE DIONES /

Voici les résultats des essais conduits dans cette série (tableau 17).

Tableau 17

Activité des acyl indane diones

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
	47		184	+	1	0
Structures anti-coagulantes.	48		700	+	1	8
	49		200	+	1	0
Structures non anticoagulantes	50		350	0	1,2	0
	51		600	non	1,4	14,6

Les trois corps n° 47 - 48 et 49 sont anticoagulants. Il faut même noter que le n° 47 est un des plus puissants corps essayés à ce sujet : en effet, nous avons recherché la dose minima active sur le lapin, dans les mêmes conditions que celles décrites page 167 pour certaines indane diones. Elle est de l'ordre de 1 mg/kg. Il faut noter que la bromuration du carbone 2 (dérivés n° 48 et 49) n'empêche pas l'énolisation et l'effet hypoprothrombinémiant.

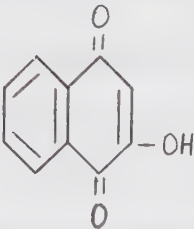
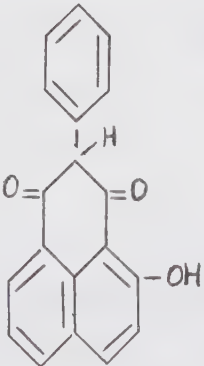
Malgré ces diverses considérations, il n'apparaît pas d'activité anti-inflammatoire dans tous les corps étudiés de cette série. La présence du troisième groupe cétonique sur la chaîne en 2 semble défavorable. L'effet antiphlogistique expérimental reste localisé à la série des indane diones.

E - DIVERS

Nous groupons dans ce dernier tableau quelques dérivés se rapprochant des séries étudiées (tableau 18).

Tableau 18

Quelques structures diverses et leurs activités pharmacologiques

Groupe	N°	Formule	DL 50 approchée per os en mg/kg	Activité anti- coagulante	Activité anti-inflammatoire	
					Test aux U.V.	Test à la carragénine
Phticol	52		150	non	1	56
Phényl 2: OH 5 péri- naphtyl indane dione 1,3	53		300	0	1	18

Ces deux produits sont inefficaces dans les deux domaines étudiés. Notons en passant le résultat obtenu avec la structure n° 52 qui est le phticol lui-même, noyau très voisin des dérivés étudiés plus haut.

V- DISCUSSION SUR LES RESULTATS DE

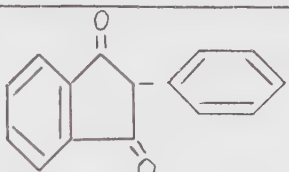
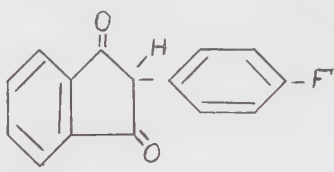
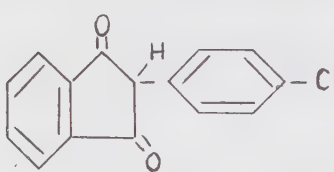
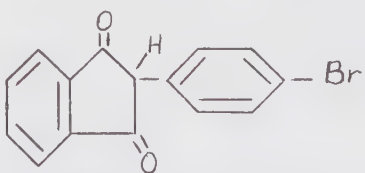
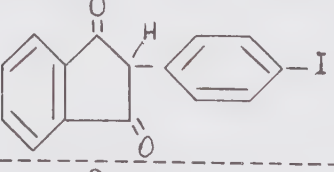
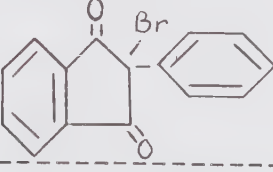
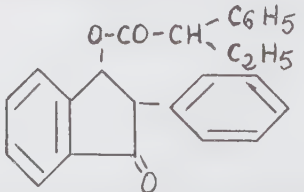
L'ETUDE DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES

// A - Considérations sur les relations structure-activité dans //
// la série étudiée //

Sur 58 produits testés, et d'après nos critères d'efficacité, les produits suivants sont nettement anti-inflammatoires (tableau 19).

Tableau 19

Corps trouvés anti-inflammatoires parmi les
58 substances étudiées

Produits	Formules
Phénindione	
n° 33	
n° 34	
n° 35	
n° 36	
n° 41	
n° 43	

Il s'agit donc de sept dérivés, tous des aryl indane diones, essentiellement la phénindione et ses dérivés halogénés.

L'activité est assez puissante puisque la comparaison de la phénindione, de l'aspirine et de la phénylbutazone a montré que l'anticoagulant a une efficacité intermédiaire entre celle des deux étalons et sur deux tests différents.

Aucune activité anti-inflammatoire n'est retrouvée dans les gamma pyrones, alpha pyrones et acyl indane diones essayées ; ces derniers corps sont pourtant structuralement voisins des indane diones.

Toutes les aryl 2 indane diones 1,3 anti-inflammatoires sont anticoagulantes. Peut-on préciser les règles d'apparition de l'effet anti-inflammatoire dans cette série ?

1°) Lorsqu'il existe une activité anticoagulante, y a-t-il toujours un effet anti-inflammatoire ?

Ceci semble généralement vérifié. Il existe même un certain parallélisme dans le niveau d'apparition des deux effets ; le corps n° 31 n'est pas anticoagulant selon nos normes. Il a fallu donner 300 mg/kg aux lapins pour obtenir une baisse substantielle du taux de prothrombine. L'examen du tableau 16 montre qu'il se situe aussi à la limite inférieure des critères que nous avons choisis pour le classement dans les corps doués d'effet anti-inflammatoire.

2°) Réciproquement, quand il n'y a pas d'effet anticoagulant, n'y a-t-il jamais d'activité anti-inflammatoire ?

Ceci semble toujours le cas dans ces indane diones ; par exemple pour les corps n° 31 - 37 - 44 - 45 et 46.

3°) Lorsque l'activité anticoagulante augmente, l'activité anti-inflammatoire s'élève-t-elle aussi ?

L'halogénéation en position para du phényl 2 exalte l'activité anticoagulante. La dose de triage dans ce domaine étant standardisée, nous avons voulu préciser ce point en déterminant pour les quatre congénères n° 33, 34, 35 et 36, la dose minima active anticoagulante sur le lapin : il s'agit de la dose minima de charge qui abaisse le taux de prothrombine de la majorité des animaux d'un lot de 5 lapins entre 35 et 15 %, zone thérapeutique habituellement recherchée par les cliniciens dans le traitement des thromboses avec ce genre de produit.

Voici nos résultats, chaque produit ayant été testé sur plusieurs lots de 5 lapins (tableau 20).

Tableau 20

Dose minima active anticoagulante sur le lapin
pour quatre dérivés halogénés de phénindione

N°	Produit	Dose minima active P.O. anticoagulante sur le lapin en mg/kg
33	Para fluoro -	41
34	Para chloro -	12,5
35	Para bromo -	5
36	Para iodo -	5

Pour autant que la méthode de triage du pouvoir anti-inflammatoire, à laquelle nous nous sommes arrêtés, permette une comparaison des activités, le dérivé iodé semble le moins actif (n° 36) sur les tests à la carragénine et l'érythème aux ultra-violets, alors qu'il est doué d'une très bonne efficacité antivitaminique K : il ne semble pas exister de relation dans les niveaux des deux activités pharmacologiques quand elles sont toutes deux présentes dans une molécule.

4°) Certains arrangements structuraux sont-ils capables de dissocier les pouvoirs anticoagulant et anti-inflammatoire respectifs ?

Quelques modifications structurales sélectives et de faible amplitude sont connues pour modifier le pouvoir hémorragipare dans la série. Qu'advient-il de l'activité anti-inflammatoire dans ces cas là ?

a) Dans le dérivé n° 37, le noyau phényl est remplacé par un pyridyl. On note la suppression des deux effets, alors que la possibilité d'énolisation est respectée pour les groupements cétoniques. Ce respect de la possibilité de tautomérisation de la molécule apparaît donc comme une condition nécessaire mais non suffisante, comme dans le cas de l'activité anticoagulante.

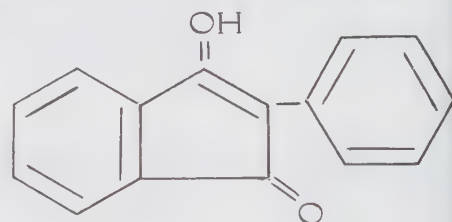
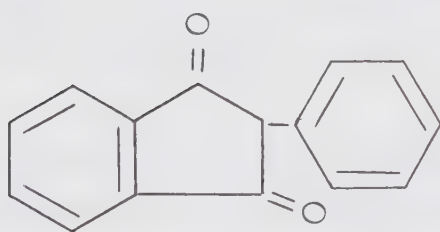
b) La charge du noyau benzénique faisant partie du noyau indane, diminue ou supprime l'action antivitaminique K.

- Pour le composé n° 38, l'halogénéation en 5 diminue l'activité anticoagulante, visible seulement avec 300 mg/kg. Il faut noter qu'il existe une certaine réponse anti-inflammatoire.

- L'addition d'un méthylène dioxy 5,6 annule les deux effets pour les composés n° 39 et 40, même en présence d'un halogène en para sur le phényl 2 (n° 40), substitution pourtant favorable.

c) Empêchement de l'énolisation.

C'est une condition importante de l'apparition des phénomènes hémorragipares.



Une des deux formes tautomères n'est pas spécialement active, mais les conditions de l'équilibre doivent être respectées. En est-il de même dans le domaine anti-inflammatoire ? En d'autres termes, le blocage de la molécule dans une forme ou dans l'autre détruit-il à la fois les deux effets pharmacologiques étudiés ?

- Certaines fixations sont réputées solides et ne peuvent conduire à une libération des groupements cétoniques libres dans l'organisme. La fixation par un radical alkyl de la quatrième valence du carbone n° 2 (composé n° 44) est dans ce cas. Dans les mêmes conditions, pour le composé n° 45, le blocage est dû à un redoublement de la molécule. Le remplacement du carbone 2 par un azote trisubstitué conduit au même résultat pour le composé n° 46. Dans

ces cas, il n'y a ni activité anticoagulante, ni effet anti-inflammatoire. Pour les dérivés n° 44 et 45, nous avons essayé des doses anticoagulantes supérieures au standard fixé de 100 mg/kg : la faible toxicité aiguë de ces corps nous y autorisait. Nous n'avons pas déclenché, chez le lapin, même à 300 mg/kg par voie orale, un abaissement du taux de prothrombine ; la libération de la quatrième valence du carbone 2 paraît bien impossible par effet métabolique.

- Dans certains cas, la fixation a un caractère beaucoup plus labile. C'est le cas de l'halogénéation du carbone 2 (composés n° 41 et 42). Dans ce cas, il y aurait libération lente de phénindione dans l'organisme. Une autre hypothèse serait que les halogènes sont très réactifs, contrairement à ceux fixés sur le benzène du noyau indane dione, permettant la fixation de la molécule sur des acides aminés avec réarrangement en naphtoquinones faiblement actives (MOLHO - 351)-). Quoi qu'il en soit, ces corps sont parfois faiblement anticoagulants à 100 mg/kg par voie orale sur le lapin, l'activité étant très nette à 300 mg/kg. Le tableau 16 montre que le dérivé n° 41 est fortement anti-inflammatoire, le n° 42 pouvant être considéré comme limite, avec une très forte réponse sur l'œdème à la carragénine. Le cas de l'estérification du carbonyle en 3 est identique (n° 43). Cet apparent blocage sous forme énolique conduit à un corps faiblement anticoagulant à 100 mg/kg ; l'activité anti-inflammatoire est certaine.

En résumé, dans cette série, il existe des anti-inflammatoires encore jamais décrits. Mais l'activité anticoagulante est peu ou prou présente dans chaque structure anti-inflammatoire, ce qui est aussi le cas quand le blocage sous forme éolique ou cétonique semble avoir un caractère labile. Au contraire, certaines substitutions à caractère solide font disparaître de concert les deux activités pharmacologiques étudiées dans ce deuxième chapitre, au moins dans le cadre des molécules mises à notre disposition. Seule la structure n° 41 semble un peu différenciée sur ce plan, puisqu'elle est très anti-inflammatoire et très peu anticoagulante. Malheureusement, dans une perspective d'emploi clinique de cette substance, il faut garder présent à l'esprit que le danger d'une hémorragie est faible mais non nul, surtout dans le cas d'un traitement continu et non d'une dose de charge unique. L'activité anticoagulante, même faible, serait alors un effet secondaire incompatible avec une maniabilité et une sécurité suffisantes.

Au total, il n'existe pas de règles nettes permettant au pharmacologue et au chimiste organicien de prévoir la dissociation des deux activités. Peut-être d'autres recherches permettraient-elles de trouver une faille dans cette conclusion qui, comme toujours, ne peut avoir qu'un caractère provisoire ; par exemple :

Extension des recherches dans le domaine :

- des flavones
- des chromones
- des alpha pyrones
- des tétralones
- des naphtoquinones
- des phtiocols.

Développement de l'étude des indane diones :

- Etudier la réponse biologique des molécules possédant d'autres substitutions sur le phényl du noyau indane.
- Rechercher l'effet de la substitution du phényl du noyau indane par un radical naphtyl.
- Envisager la réponse biologique après substitution du phényl 2 par un noyau thiophène.
- Disposer d'autres substitutions en position para sur le phényl 2.

Etude de certaines acyl indane diones à chaîne alkyl en 2 :

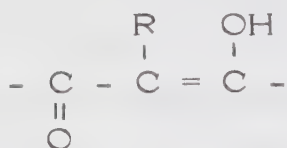
comme dans le cas du n° 51, car elles ne sont jamais anti-coagulantes.

// B - Hypothèses sur le mode d'action - Importance pratique de // // cette activité anti-inflammatoire //

L'étude de la phénindione a montré que le pouvoir anti-inflammatoire est peut-être dû en partie à un point d'attaque surrénalien. Il serait intéressant de poursuivre ces recherches dans le domaine biologique en considérant l'évolution des paramètres impliqués dans le contrôle de la décharge surrénalienne : glycémie, ascorbémie par exemple.

Existe-t-il des relations biochimiques connues entre les anticoagulants antivitaminiques K et les anti-inflammatoires ? Peu d'auteurs ont cherché à dégager la réponse. Il existe cependant au moins un point commun : les antivitamines K comme les anti-inflammatoires, sont des agents de découplage des phosphorylations oxydatives. LOOMIS et LIPMANN (1948) - 352 - baptisent "agents découplants" les produits comme le dinitrophénol 2,4 qui inhibent l'incorporation du

phosphate inorganique dans l'A.T.P. sans modifier la respiration cellulaire. Il y a production d'un excès de chaleur avec hyperthermie de l'animal traité. Il faut noter que les corps comme l'acide vulpinique, l'acide usnique, sont dans le même cas et présentent, dans leur molécule, l'enchaînement :



qui les rapproche de nos structures coumariniques. JUDAH (1952) - 353 - confirme ces résultats, montrant que les muscles d'animaux traités avec le dinitrophénol ont un très faible taux d'A.T.P.

Entre temps, WAKIM, CHEN et GATCH (1943) - 354 - indiquent que le dicoumarol a un effet hyperthermisant sur l'animal, à hautes doses. CARLSON et SEAGER (1948) - 365 - puis WALTON et coll. - 87 - (loc.cit.) confirment ces faits expérimentaux. Les anticoagulants qui nous intéressent agissent-ils par ce mécanisme ? La vitamine K 1 - dont ils sont antidotes - fait partie de la chaîne des cytochromes qui précisément transforme l'énergie des combustions cellulaires en molécules possédant des liaisons riches en énergie [MARTIUS (1954) - 356 -]. Mais il n'existe pas de parallélisme entre l'effet anticoagulant et l'effet hyperthermisant. De plus, comme l'ont montré SODERBERG et WACHTMEISTER - 88 - (loc.cit.), la vitamine K 1 est l'antidote des effets hémorragipares, mais non de l'hyperthermie.

Il est intéressant de noter que plusieurs auteurs ont montré que des anti-inflammatoires utilisés en clinique sont des découplants des phosphorylations oxydatives.

ADAM et COBB (1958) - 357 - en font la démonstration dans une préparation de mitochondries hépatiques, pour l'aspirine et la phénylbutazone. WHITEHOUSE et HASLAM (1962) - 358 - étendent ce résultat à la plupart des antirhumatismaux utilisés, non corticoïdes : par exemple la phénylbutazone, l'oxyphénylbutazone, le cinchophène, l'acide glycirrhétinique, l'acide méfénamique, l'acide flufénamique. La preuve en est faite non seulement au niveau des mitochondries hépatiques, mais aussi dans le cartilage et la cornée où la biosynthèse de l'A.T.P. semble stoppée. Il y a parallélisme entre la puissance du découplage des phosphorylations et l'activité anti-inflammatoire. WHITEHOUSE (1964) - 359 - illustre cette conclusion en montrant que l'indométhacine - nouveau venu dans la thérapeutique antirhumatismale - a la même activité thérapeutique que la phénylbutazone, et qu'il a le même pouvoir au niveau de l'inhibition des phosphorylations mitochondriales.

Voici donc un point commun entre anticoagulants antivitaminiques K et anti-inflammatoires. Mais la liaison n'est pas absolue, car de nombreux corps découplant les phosphorylations oxydatives ne sont pas anti-inflammatoires, ne serait-ce que le dinitrophénol, découplant type extrêmement puissant. D'ailleurs, de nombreuses activités pharmacologiques s'accompagnent de cet impact biologique moléculaire. Quelques auteurs ont voulu expliquer ainsi l'activité bactéricide de certains antiseptiques : EJIMA - 50 - (loc.cit.).

Enfin, la relation structurale $\begin{array}{c} \text{C} - \text{C} = \text{C} \\ \parallel \quad | \quad | \\ \text{O} \quad \text{R} \quad \text{OH} \end{array}$ qui fait effectivement partie de la structure des molécules anticoagulantes, n'existe pas dans tous les anti-inflammatoires non stéroïdiques utilisés en clinique.

Au total, il semble pour le moment difficile de donner une explication cohérente sur la liaison de ces deux activités si différentes : le pouvoir anticoagulant et l'effet anti-inflammatoire.

VI - CONCLUSION SUR LE DEUXIEME CHAPITRE

- 1°) Nous avons découvert l'existence d'anti-inflammatoires puissants dans des structures chimiques utilisées comme anticoagulants antivitaminiques K.
- 2°) Toutes les structures anticoagulantes de ce type ne sont pas anti-inflammatoires : aucune des coumarines ou des acyl indane diones essayées dans ce sens n'ont montré cette double activité.
- 3°) L'activité anti-inflammatoire semble localisée dans les aryl indane diones. Certaines de ces drogues sont actuellement commercialisées. La phénindione - la plus particulièrement étudiée et la molécule la plus simple de la série - se situe au niveau des anti-inflammatoires consacrés. Cette qualité de la phénindione a été retrouvée expérimentalement par voie externe.
- 4°) Il ne semble pas possible de dégager des règles nettes permettant de prévoir la séparation totale des deux activités pharmacologiques.
- 5°) Certains produits (n° 43 par exemple) de la série étudiée présentent un bon effet anti-inflammatoire et une faible activité anticoagulante. Nous avons expliqué pourquoi cette dernière propriété les élimine de la thérapeutique anti-inflammatoire.

Serait-il intéressant d'envisager le traitement de certaines affections par des anticoagulants doués d'efficacité anti-inflammatoire ? Deux idées peuvent retenir notre attention :

- a) la prévention du développement de l'athérome vasculaire
- b) le traitement des œdèmes phlébitiques.

a) De nombreux auteurs ont montré que, dans les thromboses, terme de l'athérome évolutif, de nombreux tests servant au dépistage des processus inflammatoires sont perturbés : EYSSERIC, BECAUD et LEBRE (1962) - 360 -. La vitesse de sédimentation du sang, la fibrinémie, certaines réactions de floculation (Vernes - Résorcine, test au Cétavlon), la quantité des séromucoïdes perchlorosolubles sont perturbées dans le même sens. Les auteurs rappellent que, dans les thromboses, comme dans d'autres processus inflammatoires, les glycoprotéines sont significativement perturbées.

Il peut être tentant de chercher à corriger par un même produit les deux phénomènes pathologiques : inflammation et coagulation vasculaire. Pour beaucoup de chercheurs, il y a un lien entre ces deux facteurs. LARCAN et coll. (1961) - 361 - étudiant les bases de l'angiopathie diabétique, source de thromboses distales, montrent que le métabolisme du tissu collagène est perturbé. HAUSS (1963) - 362 - précise que la substance fondamentale du mésenchyme est altérée dans la sclérose vasculaire thrombosante. WAHL (1963) - 363 - conclut que dans l'athérosclérose, l'inflammation existe, source d'une perméabilité pariétale. Ces considérations nous éloignent un peu des problèmes proprement pharmacologiques qui sont notre propos. Elles y débouchent cependant immédiatement ou à terme, tant il est vrai que physiologie, pharmacologie, biologie cellulaire et thérapeutique sont intimement liées.

b) Les phlébites, ou coagulations intravasculaires veineuses, s'accompagnent toujours de phénomènes inflammatoires et œdémateux. Déjà nous avons signalé l'emploi de la phénindione en pommade dans le traitement de tels troubles. MILSTEIN (1960) - 364 - a préconisé la phénindione dans le même but, pour le traitement d'une affection où thrombose veineuse et inflammation sont liées : les hémorroïdes. D'autres auteurs ont utilisé les anti-inflammatoires en même temps que les anticoagulants ou à leur place. Les auteurs allemands, passant outre au simple danger thrombogène de cette affection, traitent les phlébites uniquement avec la phénylbutazone [HOFMANN et RAPPE (1964) - 365 -]. MORETTI, STAEFFEN et coll. (1960) - 366 - proposent l'addition d'une corticothérapie au traitement anticoagulant des phlébites.

Un mouvement d'idées se dégage par conséquent dans ce domaine.

6°) Enfin, il n'existe pas pour l'instant, d'explication biologique cohérente sur la localisation de cette activité anti-inflammatoire aux structures "aryl indane diones".

TROISIEME CHAPITRE

ETUDE DES PROPRIETES CHOLERETIQUES

DE DERIVES DES INDANE DIONES

ALPHA, GAMMA PYRONES

ET CORPS VOISINS

I - INTRODUCTION - PLAN DU CHAPITRE

La recherche d'une activité cholérétique nous a été suggérée par des observations cliniques éparses de chasse biliaire sous traitement avec divers anticoagulants antivitaminiques K. De plus, la phényl indane dione subit selon SCHLERT et coll. (1954) - 367 - un cycle entéro-hépatique qui évoque la possibilité d'un effet cholérétique.

Nous nous sommes attachés à rechercher cet effet excréteur dans les noyaux chimiques des "anticoagulants potentiels", coumarines, aryl indane diones 1,3 et acyl indane diones 1,3. Des chercheurs avaient précédemment abordé sur ce plan des séries structuralement apparentées.

- CHABROL et coll. (1925) - 368 -, KAUFTHEIL et RAPPORT (1932) - 369 -, CHARLIER (1953) - 370 - avaient trouvé des dérivés salicylés puissamment cholérétiques. Particulièrement, la para hydroxy phényl salicylamide a retenu l'attention de CHARLIER, le corps recevant une consécration clinique. BRODIE et WEINER (1954) - 371 - ont déjà montré les relations structurales existant entre coumariniques et dérivés salicylés. Rappelons que ces derniers sont les termes de la dégradation de la molécule coumarinique par fusion alcaline.

- Récemment, BEZANGER et BEAUQUESNE (1964) - 372 - précisent le pouvoir cholérétique de toute une série de flavones (rutoside, quercitoside, etc...).

- GUILLEMAN (1958) - 373 -, BRUNAUD et coll. (1958) - 374 - font de même avec certaines chalcones. Un produit au moins donne lieu à la création d'un médicament : la triméthoxy 4, 2', 4' chalcone.

- PESSON et coll. (1959) - 375 - précisent l'efficacité cholérétique des cinnamates et de l'acide alpha phényl cinnamique. Un corps confirme son intérêt thérapeutique : l'alpha phényl ortho méthoxy cinnamate de magnésium. BRUNAUD note que la cyclisation en dérivés coumariniques est défavorable à la cholérèse, ce que nous infirmerons. GRANGER (1959) - 376 -, GIROUX et coll. (1958) - 377 - insistent sur des acides cinnamiques pourvus d'une chaîne N acyl aminée en alpha du carboxyle. Nous serons amenés à étudier les dérivés coumariniques azotés correspondants. Rappelons qu'il s'agit d'acide transcinnamique, les dérivés cis instables conduisant aux coumarines.
- Les coumarines elles-mêmes, et encore moins les indane diones 1,3, n'ont pas longtemps retenu l'attention des chercheurs quant à leur pouvoir cholérétique. Depuis le début de notre travail et après l'obtention de nos premiers résultats, MOLHO et coll. (1961) - 378 - MOLHO et coll. (1962) - 379 -, seule l'équipe de SELLERI (1965) - 380 - et - 156 - (loc.cit.), a donné quelques résultats positifs sur des coumarines carboxylées diurétiques et cholérétiques.

Le problème de savoir s'il existe des cholérétiques parmi les anti-coagulants oraux utilisés en thérapeutique et dans les coumarines, aryl 2 et acyl 2 indane diones 1,3 voisines, reste entier.

Dans l'exposé qui va suivre, nous examinerons dans une première partie les méthodes d'étude de l'activité cholérétique expérimentale et nous justifierons notre choix méthodologique.

Dans une seconde partie, nous examinerons l'activité cholérétique d'anticoagulants connus du groupe des coumarines, des indane diones et des acyl indane diones.

Dans une dernière partie, nous étendrons cette recherche à des composés de même structure chimique, nouveaux ou d'activité pharmacologique inconnue. Nous chercherons à dissocier les activités anticoagulantes et cholérétiques. Cette dernière démarche portera ses fruits. Nous préciserons les modifications structurales capables d'augmenter l'efficacité cholérétique des coumarines non anticoagulantes. Nous conclurons ce travail en choisissant un corps suffisamment puissant pour justifier une étude particulière ultérieure.

II - METHODES D'ETUDES

Nous fixons notre choix sur les méthodes d'étude de la cholérèse, les plus rapides et les plus économes de produit. Nous éliminons ainsi l'étude de la cholérèse par fistulisation en chronique chez le chien. Le moyen retenu doit différencier effet cholérétique et effet cholagogue. Certaines revues générales assez récentes ont fait le point dans ce domaine méthodologique : BOUCARD (1957) - 381 -, BIZARD et VANLERENBERGHE (1956) - 382 -, BIZARD et PARIS (1957) - 383 -.

Le travail comporte aussi une évaluation du pouvoir anticoagulant des drogues testées.

1 - METHODE D'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTICOAGULANTE

La méthode choisie est celle décrite au deuxième chapitre. Rappelons qu'il s'agit de définir la réponse biologique des lapins à une dose standard ingérée de 100 mg/kg de chaque produit testé. Le temps de QUICK, méthode retenue, permet de suivre chaque jour pendant plusieurs jours l'effet hypoprothrombinémiant éventuel de cette dose unique. Nous renvoyons le lecteur au deuxième paragraphe du deuxième chapitre.

2 - METHODE D'ETUDE DE L'ACTIVITE CHOLERETIQUE

A - Revue critique des méthodes existantes - choix personnel des divers paramètres -

a) Etude in vitro ou in vivo :

In vitro :

Citons par exemple la méthode utilisant le foie de rat isolé perfusé avec le sang de la même espèce, telle que BIZARD

l'a décrite (1958) - 384 -. Cette méthode est surtout adaptée à l'étude analytique des phénomènes concourant à la biligénèse.

In vivo :

- Sur l'animal vigile, de nombreux auteurs procèdent à la fistulisation chronique du cholécyste. Cette technique est délicate et d'un mauvais rendement opératoire. Le chien paraît le plus adapté selon GIROUX, BEAULATON et BOUCARD (1964) - 385 -. Cette technique est aussi appliquée au rat. Citons : FRIEDMANN (1950) - 386 -, COLWELL (1951) - 387 -, CLEMENT (1954) - 388 -, GERBET (1958) - 389 -, BOUCARD et ABELA (1963) - 390 -.

Dans certains cas, les auteurs maintiennent le rat dans un système de contention qui peut être générateur d'ulcères gastriques "de contrainte". Dans d'autres cas, l'animal est libre, mais la bile est recueillie dans une poche en caoutchouc disposée entre le péritoine et la paroi musculaire abdominale.

- Sur l'animal endormi, la plupart des auteurs procèdent au triage pharmacologique des drogues. Cette méthode de fistulisation temporaire permet une grande cadence de travail. Nous avons préféré cette technique sur un animal entier, où les problèmes de l'absorption intestinale sont abordés d'emblée, où la simplicité du travail sur l'animal endormi permet des recoupements rapides au stade de la pharmacologie indicative. Selon GIROUX, BOUCARD et

BEAULATON (1956) - 391 - plusieurs méthodes d'étude des cholérétiques sont nécessaires au stade des travaux complémentaires mais une seule suffit au stade du triage.

b) Choix de l'espèce :

Le chien est un animal de prix élevé, pratiquement jamais de race pure, nécessitant beaucoup de produit, conduisant à une petite cadence de travail. L'étude des cholérétiques nécessite la ligature de la voie biliaire du cystique puisqu'il existe une vésicule biliaire. A son actif, notons la fourniture de grands volumes de bile permettant les dosages de tous les constituants. Parmi d'autres, CHABROL (1930) - 392 -, BARGETON (1952) - 393 -, CHIHARA (1952) - 394 -, CHARLIER - 370 - (loc.cit.), LA BARRE (1955) - 395 -, DELAS et ROUX (1957) - 396 -, LINET (1962) - 397 -, BRU-NAUD - 374 - (loc.cit.), CAHEN (1963) - 398 -, ROUX (1960) - 399 - ont fixé leur choix sur cette espèce dans un propos qui était proche de celui qui nous préoccupe.

Le chat est rarement utilisé : comme tous les carnivores, il donne très peu de bile [AUCLAIR (1964) - 400 -].

Le lapin, selon BARGETON (1946) - 401 - ne répond bien qu'aux sels biliaires. Il est très peu utilisé par les auteurs.

Le cobaye, comme le lapin et tous les herbivores, a un débit biliaire régulier et abondant. HILDEBRANDT (1954) - 402 -, GRANGER et GIROUX - 376 - (loc.cit.), PESSON, SALLE et AUFFRET - 375 - (loc.cit.) ont préféré cette espèce. Cependant, cet animal - anesthésié -

est très fragile et les réponses cholérétiques sont peu groupées dans un lot, selon PESSON, SALLE et AUFFRET.

Le rat a le plus large emploi, surtout après anesthésie. On peut l'obtenir de race pure, il nécessite peu de produit. Il est facile d'observer chez cet animal privé de vésicule, un effet proprement cholérétique sans manipulations supplémentaires. Il répond bien à tous les cholérétiques décrits. Voici, dans une période récente, quelques auteurs ayant fait ce choix : KALOW (1949) - 403 - compare cinq espèces et préfère le rat. GUNTER et KIM (1950) - 404 - remarquent que le débit biliaire du rat est beaucoup plus régulier que celui du chien. FORSTER (1954) - 405 - conclut de même, ainsi que BLANC (1958) - 406 -. BIZARD et VANLERENBERGHE (1958) - 407 - insistent sur l'obtention beaucoup plus facile d'un poids constant des sujets en expérience avec le rat. MORIN, MAILLARD et BENARD ne précisent pas la raison de leur choix (1958) - 408 -. Pour RORHBACH et ROBINEAU (1958) - 409 - le rat permet seul les multiples essais nécessités par un triage pharmacologique. ENGELHORN (1960) - 410 - accorde une grande valeur au rat qui lui permet de préciser le débit de base sur cet animal après 100 mesures témoins.

A leur suite, de nombreux auteurs utilisent le rat sans justifier plus amplement ce choix : TURBANTI (1960) - 411 -, PUNTURIERI (1961) - 412 -, VAILLE (1961) - 413 -, BUU HOI (1961) - 414 -, BUTTINI (1962) - 415 -, CASADIO (1962) - 416 -. DEBRAY, VAILLE et DE LA TOUR (1962) - 417 - mettent au point, sur le rat, la séparation des sucs biliaires et pancréatiques avec dosage des

principaux constituants par des microméthodes. GEORGES et PAGE (1963) - 418 -, MARAZZI UBERTI (1965) - 419 - et CAUJOLLE (1965) - 420 - accordent encore leur préférence au rat. On peut dire que ce choix est devenu tout à fait prédominant dans ces dernières années.

Nous avons depuis longtemps fixé notre choix sur le rat Wistar, provenant d'un seul élevage.

c) Souche, sexe, poids :

La mesure du débit biliaire ne semble pas être affectée, selon les auteurs, par le sexe de l'animal d'expérience. Comme BLANC - 406 - (loc.cit.), nous préférons les mâles, permettant une administration facile par voie veineuse (veine du pénis) en cas de besoin. Le poids des rats peut varier de 200 g à 450 g selon ENGELHORN - 410 - (loc.cit.), RORHBACH - 409 - (loc.cit.) et MORIN - 408 - (loc.cit.) par exemple. Nous utilisons des animaux d'au moins 200 g ; au-dessous, la canulation du cholédoque devient aléatoire. La souche est un paramètre qui n'est pas toujours précisé. L'essentiel est de se tenir toujours au même élevage. Tout notre essai est conduit sur des rats Wistar mâles de 200 g à 250 g provenant d'un même élevage.

d) Choix de l'anesthésique :

C'est le problème le plus débattu. Pratiquement, trois anesthésiques sont utilisés : chloralose - uréthane - barbiturique.

- Le plus ancien est le chloralose, particulièrement employé par CHABROL et CHARONNAT (1931) - 421 - surtout sur le chien. Il a aussi été préconisé pour d'autres espèces. Certains auteurs lui restent fidèles : CHARLIER - 370 - (loc.cit.), CAHEN - 398 - (loc.cit.), à la dose de 0,12 g/kg par voie I.V. Le principal inconvénient du chloralose est qu'il est lui-même cholérétique. La solution préconisée est d'attendre la fin de cette hypercholérèse pour procéder aux mesures : en général, il faut attendre deux heures [BARGETON - 401 - (loc.cit.) et CAHEN - 398 - (loc.cit.)]. L'effet de l'anesthésique s'épuisant, il faudrait réinjecter, ce qui déclenche une nouvelle hypercholérèse : on ne dispose finalement que de 1 h 30 à 2 h pour conduire un essai, délai trop court pour examiner des produits à longue durée d'action.
- L'uréthane est un anesthésique puissant ne modifiant pas la cholérèse. Les auteurs l'utilisent par voie sous-cutanée : tels ROHRBACH et ROBINEAU - 409 - (loc.cit.) qui montrent que 1,5 g/kg amène seulement en 6 heures une baisse de 4 % du débit biliaire initial. MORIN - 408 - (loc.cit.) l'utilise par voie I.P. à 1,25 g/kg, PESSON et coll. - 375 - (loc.cit.) à la dose de 1 g/kg sur le cobaye, par voie péritonéale. VAILLE - 413 - (loc.cit.) est pour l'uréthane contre le mébubarbital, de même que GEORGE et PAGE - 418 - (loc.cit.).

- Les barbituriques sont largement utilisés. Il s'agit surtout du mébubarbital ou Nembutal, d'induction rapide, pouvant être réinjecté sans modifier le débit de départ, utilisable pour toutes les espèces. Par exemple, GUNTER et KIM - 404 - (loc.cit.), BIZARD et VANLERENBERGHE - 407 - (loc.cit.), fixent leur choix sur cet anesthésique à la dose de 40 mg/kg par voie péritonéale. DELAS et ROUX - 396 - (loc.cit.) montrent qu'il convient également au chien, au chat, au rat et au lapin, qu'il est d'une grande souplesse d'utilisation et permet une anesthésie liminaire entretenue. Cependant, BIRNIE (1951) - 422 - pense que ces barbituriques abaissent la cholérèse en déclenchant une légère atteinte hépatique, ce qui n'est pas l'opinion de BIZARD et VANLERENBERGHE (1962) - 423 -. Ces auteurs montrent que le mébubarbital n'affecte que faiblement le débit biliaire et qu'il ne modifie ni la qualité de la bile excrétée, ni l'excrétion de la bromo phénol sulfone phtaléine.

De toute façon, la plupart de ces anesthésiques généraux abaissent la température centrale. Cet abaissement lent et régulier peut atteindre plusieurs degrés, particulièrement avec les barbituriques découpleurs des phosphorylations oxydatives. La cholérèse dépend beaucoup de la température de l'animal : BOUCARD et NEGRE (1964) - 424 -. Il faut maintenir la température rectale à sa valeur initiale, par réglage manuel d'une table chauffante [VANLERENBERGHE GUERRIN et coll. (1960) - 425 -], par thermostat ou par un système automatique déclenchant le chauffage de la table d'opération lorsque la température rectale, contrôlée par thermistance, descend à une certaine valeur.

Nous choisissons le mébubarbital à la dose de 45 mg par kg de poids corporel et par voie péritonéale chez le rat, en sachant bien qu'aucun anesthésique n'est parfait. Mais l'emploi constant d'un seul anesthésique dans toute la série des essais permet une comparaison valable des résultats. Nos animaux sont disposés sur une table chauffante réglée à 38°C, température nécessaire pour maintenir la température rectale des rats à une valeur voisine de 37°C.

e) Nature des prélèvements :

Sur l'animal endormi, le cathétérisme du cholédoque amène la bile à l'extérieur, selon la technique largement utilisée par CHABROL sur le chien. Nous prélevons la bile par fistulation haute du canal biliaire. Comme l'ont montré DEBRAY, VAILLE et DE LA TOUR - 417 - (loc.cit.), le canal pancréatique débouche chez le rat dans le bas cholédoque. En prélevant la bile à un niveau proche de l'abouchement intestinal, on s'expose à une erreur dans la mesure du débit biliaire puisque les quantités de liquide récupérées sont alors un mélange de bile et de suc pancréatique. D'autant que, selon les auteurs précédents, certains cholérétiques stimulent aussi l'excrétion pancréatique.

Nous choisissons le cathétérisme bas situé, technique plus facile, encore que non dénuée d'embûches. Nous utilisons des cathéters spéciaux de la marque suivante : TR 339 n° 1 - diamètre intérieur : 0,5 mm - diamètre extérieur : 1 mm - fabricant : laboratoires BRUNEAU - 17, rue de Berri à PARIS (8°). La bile est recueillie dans des tubes gradués en micro-litres.

f) Voie d'administration du produit à tester :

Les animaux doivent-ils être à jeun au moment de l'essai ?

Les auteurs sont partagés :

- oui pour ROHRBACH et ROBINEAU qui maintiennent le jeûne pendant la nuit précédant l'essai - 409 - (loc.cit.),
- oui pour PESSON, SALLE et AUFFRET, avec 6 h de jeûne - 375 - (loc.cit.),
- non pour BIZARD, VANLERENBERGHE et ROBELET - 407 - (loc.cit.).

Nous préférons utiliser des rats à jeun de nourriture depuis 18 heures, ce qui régularise l'absorption intestinale.

Beaucoup d'auteurs testent les produits par voie intraveineuse. CHABROL élimine aussi la barrière intestinale (1955) - 426 -. BIZARD et VANLERENBERGHE - 407 - (loc.cit.) utilisent la veine jugulaire du rat, BLANC - 406 - (loc.cit.) la veine du pénis sur la même espèce. La réponse est alors plus instantanée. Mais cette voie pose au pharmacologue le problème de l'essai des substances non hydrosolubles.

La voie duodénale semble tout indiquée. PESSON, SALLE et AUFFRET canulent le duodénum du cobaye après fistulisation - 375 - (loc.cit.). BLANC - 406 - (loc.cit.), BUTTINI - 415 - (loc.cit.) font de même sur le rat.

Nous choisissons la voie intra-duodénale après laparotomie haute sur la ligne médiane du rat anesthésié. La première anse duodénale est exposée. L'injection des produits est faite dans la lumière intestinale par une fine aiguille (6/10e). Le délabrement local est ainsi minimum. L'injection est faite en direction aval. Un lac est passé autour de l'intestin grêle au-dessus de l'injection, afin d'empêcher les régurgitations vers l'estomac.

Nous avons eu l'occasion de préciser ce problème des régurgitations possibles avec un des produits testés (corps n° 11). Après injection du volume standard de 0,5 ml contenant 5 mg de corps n° 11 pour 100 g de poids vif, nous n'avons placé aucune ligature amont. Après la fin de la période d'essai (2 heures), nous avons examiné le liquide stomacal. La recherche du produit est facilitée par sa grande fluorescence en lumière de WOOD. Le contenu stomacal présentait alors une fluorescence bleue caractéristique. Dans ce même essai, la ligature de l'intestin n'a pas amélioré la réponse cholérétique : il n'y a pas eu de défaut d'absorption, comme on pouvait le craindre du fait de l'arrêt partiel de la circulation sanguine : des suppléances suffisantes se sont installées. Ce contrôle a été précisément rendu possible par dosage du produit n° 11 excrété dans la bile, en présence ou en absence de ligature intestinale. La méthode spectrofluorimétrique employée sera décrite au quatrième chapitre de ce travail.

Tableau 21

Influence de la ligature du duodénum
sur l'absorption d'un cholérétique coumarinique
le corps n° 11

	Avec ligature duodé- nale en amont de l'injection	Sans ligature duodénale
Nombre de rats	2	2
Dose de corps n° 11 en I.D.- aiguille 6/10e	50 mg/kg	50 mg/kg
Recherche du corps n°11 dans le suc gastrique	0	+
Excrétion biliaire - quantité éliminée dans le temps de l'essai	1.424 µg	1.001 µg

Au total, la ligature de l'intestin, juste en amont de
l'injection dans la lumière duodénale :

- n'empêche pas l'absorption du corps essayé,
- empêche sa régurgitation dans l'estomac,

dans les conditions de durée de l'essai.

g) Les solvants employés :

Quelques-uns des dérivés fournis sont des sels sodiques
solubles dans l'eau. Beaucoup sont insolubles dans l'eau,
mais capables de donner une forme énolique soluble en milieu
alcalin (NaOH N/10). Dans quelques cas, nous avons dû

dissoudre la substance dans le propylène glycol, dans un volume de solvant connu pour ne pas agir sur la cholérèse : ROHRBACH - 409 - (loc.cit.) propose la limite de 0,5 ml pour 100 g de poids corporel. Très rarement, toute dissolution étant impossible, nous avons dû disperser les cristaux finement pulvérisés du produit, dans une suspension de gomme arabique à 3 % dans l'eau distillée. Le volume standard est toujours de 1 ml pour 200 g de poids corporel.

Dans la plupart de nos essais, le pH de la solution injectée dans le duodénum est de 8,5 / 9. Nous avons dû vérifier qu'un tel volume d'une solution à ce pH ne modifiait pas la cholérèse.

Ces sels d'acides faibles doivent normalement libérer dans l'estomac les acides correspondants. Comme souvent, ces produits acides sont peu absorbés en absence de bile dans la lumière de l'intestin. Dans les conditions de nos essais c'est bien le cas puisque toute la bile est dérivée à l'extérieur pour être mesurée. Au total, l'absorption intestinale n'a lieu, dans de bonnes conditions, qu'avec les sels sodiques solubles, directement injectés dans le duodénum ou avec les acides correspondants, mais en présence d'une petite quantité de bile. Nous avons vérifié ce point en comparant l'activité cholérétique d'une dose standard de déhydrocholate de sodium ou d'acide déhydrocholique, sur le chien endormi au mébubarbital. Les produits étaient donnés dans un volume de 1 ml/kg. Nous avons utilisé en tout huit chiens pour cet essai préliminaire.

Tableau 22

Importance de la présence de la bile
dans l'absorption duodénale
de certains acides organiques cholérétiques

Produit injecté dans le duodénum du chien	Dose Forme injectée	Effet sur le débit biliaire mesuré par cathétérisme
Déhydrocholate de sodium	50 mg/kg solution	+++
Acide déhydrocholique	50 mg/kg suspension gommeuse	0
Bile propre Vésicule du chien	2 ml solution	0
Bile propre 2 ml + Acide déhydrocholique	2 ml de bile + 50 mg/kg	+++

Ces résultats justifient notre choix de la forme sodique dissoute dans l'eau et injectée dans la première anse duodénale.

h) Choix de la dose des produits à tester :

Deux écoles s'affrontent à ce sujet : certains auteurs préférèrent comparer l'activité d'une série de produits, à dose fixe : soit ramenée à l'animal entier, comme le préconise VAILLE (1964) - 427 -, reprenant la position plus ancienne de CHABROL, soit en donnant une quantité définie par kg de poids corporel. Dans ce dernier cas, nous pouvons citer par exemple : GRANGER et GIROUX - 376 - (loc.cit.)

avec 100 mg/kg par voie I.V., PESSON, SALLE et AUFFRET - 375 - (loc.cit.) avec 200 mg/kg par voie duodénale, BUU HOI - 414 - (loc.cit.) avec 100 mg/kg par voie duodénale, BUTTINI - 415 - (loc.cit.) avec 200 mg/kg par la même voie, ENGELHORN - 410 - (loc. cit.) et VANLERENBERGHE - 425 - (loc.cit.) avec 200 mg/kg par la voie I.D. et I.V., ainsi que GEORGES et PAGE - 418 - (loc.cit.) avec 20 mg/kg par voie I.V.

D'autres auteurs donnent des doses variables par exemple en fonction de la masse moléculaire. CASADIO - 416 - (loc.cit.) donne une millimole/kg de chaque produit, ce qui peut être rationnel dans l'étude d'une série présentant une structure chimique homogène.

Nous choisissons une dose standard de 50 mg/kg par voie intra-duodénale. Au-dessous de cette dose, nous risquons de ne pas retenir un corps intéressant.

Notons la différence de position avec le triage anti-inflammatoire où la dose donnée était une dose variable (voir le chapitre II), fraction de la dose léthale 50 souris même voie. La cholérèse est plus indépendante de la toxicité des drogues, au moins dans une large mesure. Il n'est pas décrit d'inhibition de la cholérèse pour de hautes doses. Nous nous sommes donc ralliés à la majorité des auteurs par l'emploi d'une dose standard par kg de poids corporel.

i) Durée de l'essai - importance du lot d'animaux :

Dans ces essais de fistulisation aiguë sur l'animal endormi, chaque animal doit être son propre témoin. Deux temps sont à considérer :

- le temps de base : donnant l'excrétion biliaire de base..
La durée d'observation doit être
suffisante pour fixer une valeur précise..
- le temps de réponse : c'est la période d'examen de la
réponse cholérétique après traitement
des animaux.

De plus, le nombre d'animaux peut varier selon la précision recherchée et les disponibilités en produit.

Pour les auteurs, le cas du chien endormi au chloralose exige des précautions spéciales évoquées plus haut. Rappelons qu'il nous paraît délicat de traiter l'animal par deux cholérétiques successivement. Dans le cas des autres espèces, le temps de base varie de 1 à 2 heures et le nombre d'animaux par lot, de 4 à 12.

Par exemple :

Tableau 23

Durée du temps de base et nombre d'animaux par lot
chez divers auteurs étudiant la cholérèse

Auteurs	Espèces	Durée des temps de base	Nombre d'ani- maux par lot
MORIN - 408 - (loc.cit.)	rat	2 h	10 rats
BLANC - 406 - (loc.cit.)	rat	2 h	non précisé
PESSON et coll. - 375 - (loc.cit.)	cobaye	1 h	8 cobayes
BUU HOI - 414 - (loc.cit.)	rat	non précisé	4 rats
BUTTINI - 415 - (loc.cit.)	rat	non précisé	12 rats
VANLERENBERGHE - 425 - (loc.cit.)	rat	1 h	12 rats
ROHRBACH - 409 - (loc.cit.)	rat	2 h	non précisé

La stabilité de l'écoulement de base semble plus grande pour le rat et le cobaye que pour le chien.

Nous choisissons un temps total d'au moins 3 heures, le débit biliaire du rat étant relevé chaque demi-heure. Deux prélèvements consécutifs (1 heure en tout) donnent le débit de base. Après traitement I.D., la réponse excrétrice est notée pendant au moins deux heures, jusqu'à l'arrêt de l'hypercholérèse.

Nous utilisons des lots de 8 rats mâles pour chaque essai. Ce nombre est lié au mode d'expression des résultats sur lequel nous allons conclure.

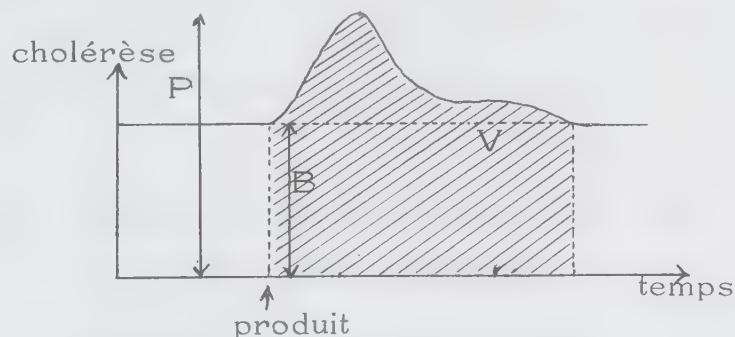
j) Expression des résultats :

Pour comparer l'effet de produits voisins, il faut une expression simple, par exemple sous forme de coefficient. Ce dernier doit inclure les variations de nombreux paramètres :

- nombre d'animaux du lot ayant répondu positivement,
- importance de la réponse excrétrice,
- durée de l'hypercholérèse.

Il n'y a aucun accord chez les auteurs à ce sujet.

Comme beaucoup d'auteurs après eux, CHABROL et CHARONNAT - 392 - (loc.cit.) établissent la courbe d'hypercholérèse en fonction du temps pour chaque animal. Il est vrai qu'il s'agit de chiens chloralosés dont la cholérèse de base et la réponse aux produits sont très variables. ROHRBACH et ROBINEAU - 409 - (loc.cit.) définissent sur le cobaye les deux valeurs suivantes :

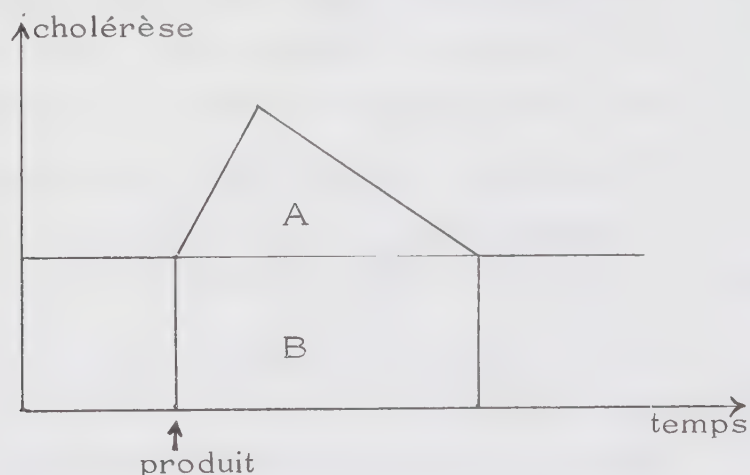


(V est la partie hachurée).

- cholérèse de pointe = $P - B$
- hypercholérèse totale = $V - B$.

Il en résulte un classement des produits selon deux critères, ce qui rend complexe toute exégèse.

VANLERENBERGHE, GUERRIN et coll. (1960) - 428 -
définissent sur le rat, un coefficient d'activité tel que $\frac{A+B}{B}$
selon les valeurs définies dans le schéma suivant :



PESSON, SALLE et AUFFRET - 375 - (loc.cit.), sur
le cobaye, définissent les paramètres suivants :

A : Pourcentage d'animaux du lot ayant répondu positivement,
par élévation de la cholérèse au-dessus d'un seuil
significatif.

B : Pourcentage moyen d'élévation de la cholérèse pour
l'ensemble du lot.

C : Durée de cette hypercholérèse.

La valeur cholérétique du produit est donnée par le produit

$$A \times B \times C.$$

Nous-mêmes, nous inspirant de ces derniers auteurs, avons retenu les mêmes critères. Notre choix a été guidé par l'examen des résultats obtenus sur 10 lots de 8 rats avec l'excipient le plus utilisé dans les essais : une solution aqueuse alcaline à pH 8,5 / 9, donnée à raison de 0,5 ml pour 100 g de poids vif et sur la réponse de nos animaux à des étalons reconnus (déhydrocholate de sodium par exemple).

α - Variations spontanées du débit biliaire :

L'examen de 480 valeurs recueillies (10 essais - 8 rats par essai - 6 mesures demi-horaires par rat) conduit aux constatations suivantes :

- 1 - Le débit est variable d'un rat à l'autre.
- 2 - Il semble assez constant pour un rat donné, comme l'ont déjà précisé les auteurs.
- 3 - Il existe des séries de 8 rats ayant un débit initial élevé (par exemple : lot test n° 6) et d'autres un débit plutôt faible (lot n° 10) comme le montrent les deux tableaux suivants.

Tableau 24

Essai du solvant alcalin (0,5 mg/100g I.D.) sur 8 rats
 dans les conditions de l'essai
 Evolution de la cholérèse 1 h avant et 2 h après l'injection

Essai solvant n° 6

Injection I.D. du solvant



N° des rats	Poids en grammes	Débit biliaire en microlitres par demi-heure					
		1°	2°	3°	4°	5°	6°
1	220	445	450	480	480	490	415
2	200	470	415	415	395	490	420
3	210	400	360	350	285	205	365
4	200	430	425	410	495	510	490
5	220	495	530	490	515	505	500
6	230	435	450	460	480	485	490
7	220	350	335	275	390	320	400
8	210	425	405	360	410	420	400
Débit moyen des 8 rats en microlitres		431	421	405	444	428	435

Tableau 25

Essai du solvant alcalin 0,5 mg/100 g I.D.) sur 8 rats
 dans les conditions de l'essai
 Evolution de la cholérèse 1 h avant et 2 h après l'injection

Essai solvant n° 10

Injection I.D. du solvant

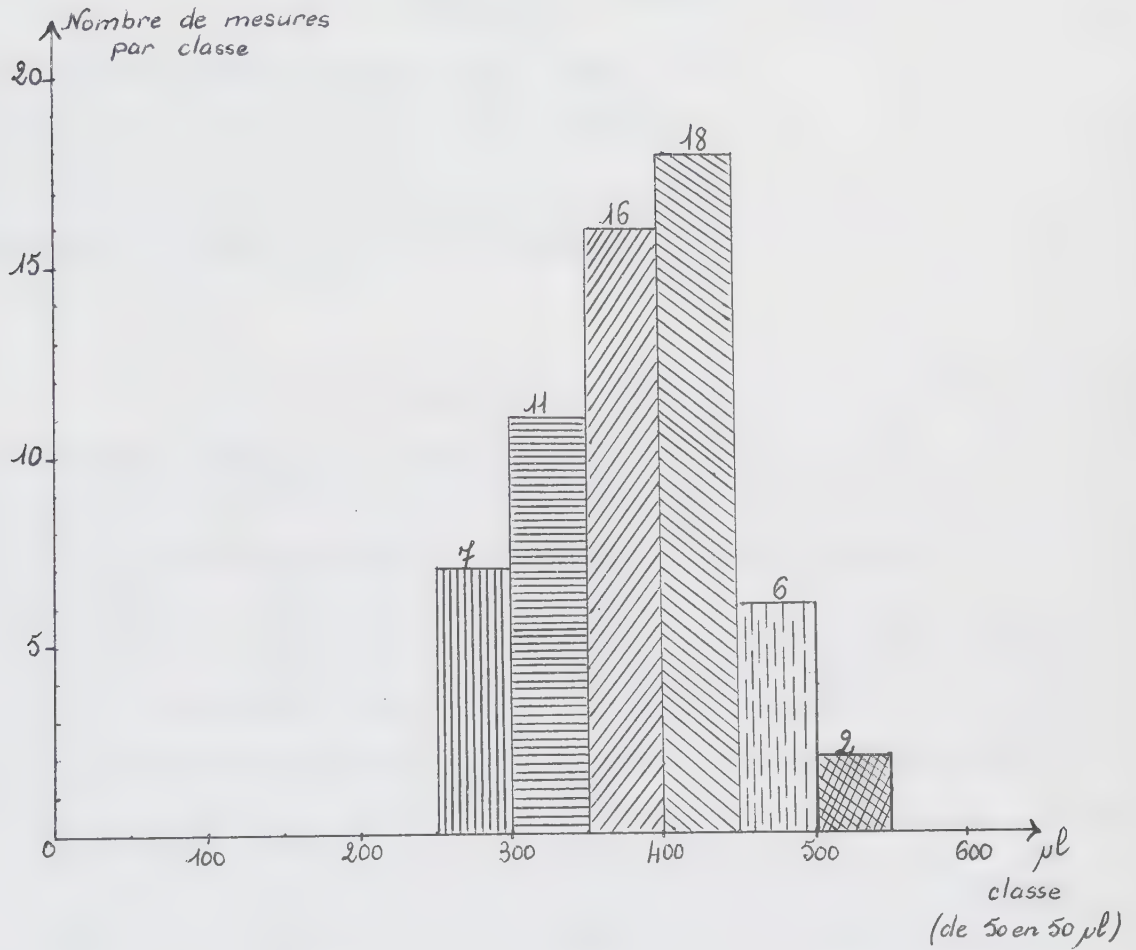
N° des rats	Poids en grammes	Débit biliaire en microlitres par demi-heure					
		1°	2°	3°	4°	5°	6°
1	200	345	380	325	385	365	485
2	115	340	320	345	435	475	390
3	180	310	290	305	370	405	420
4	195	340	295	390	320	300	330
5	200	285	354	275	255	265	260
6	200	340	335	245	320	325	305
7	205	360	375	390	350	335	305
8	205	350	260	300	260	270	260
Débit moyen des 8 rats en microlitres		334	325	322	337	330	344

L'examen des valeurs moyennes de l'excrétion biliaire pour les 8 rats à chaque demi-heure semble assez stable au cours de l'essai, et particulièrement par rapport au niveau moyen initial (première demi-heure). La réponse globale est assez bien groupée pour un essai donné, mais un peu variable d'un essai à l'autre ; peut-être s'agit-il de variations journalières dues à la saison ou au micro-climat de la salle de travail.

- 4 - En établissant l'histogramme des 60 mesures moyennes demi-horaires, nous constatons un bon groupement de la population des résultats. Chaque valeur est la moyenne de 8 mesures (essai sur des lots de 8 rats), ce qui représente 480 mesures de débit.

Tableau 26

Histogramme des débits biliaires "témoins"
sur 60 valeurs moyennes de 8 mesures demi-horaires



On constate un bon groupement des valeurs de débit en fonction du temps, avec une faible dispersion sur une seule population.

En résumé, un lot de 8 rats nous semble un nombre suffisant d'animaux.

β - Temps de base et seuil significatif de l'élévation de la cholérèse :

ou temps de mesure du débit avant traitement par le produit aux essais.

Ce choix (30 minutes, 1 h ou 1 h 30) est basé sur l'examen des dix essais avec le solvant habituel. Le tableau suivant résume l'ensemble des moyennes relevées pendant les trois heures d'expérience.

Tableau 27

Diverses valeurs moyennes de débits biliaires observées sur le rat après traitement par le solvant habituel

N° de l'essai sur 8 rats	Valeur de la 1 ^{re} mesure à 30 minutes (moyenne des 8 rats) M1 en μ l	moyenne des 2 premières mesures (1 h en tout) sur 8 rats M2 en μ l	moyenne des 4 dernières mesures sur 8 rats M3 en μ l	moyenne des 6 mesures de l'essai sur 8 rats M4 en μ l	Différence entre M2 et M3 en %
1	300	298	324	315	+ 8 %
2	413	401	408	406	+ 1,7 %
3	405	395	399	398	+ 1 %
4	451	460	492	481	+ 7 %
5	380	371	378	378	+ 0,2 %
6	431	426	428	427	+ 0,4 %
7	443	444	448	447	+ 0,9 %
8	375	371	386	381	+ 4 %
9	397	397	378	384	- 4,7 %
10	334	330	333	331	+ 0,9 %

L'examen de ce tableau montre que la moyenne des deux premières mesures (M2) est plus proche de la moyenne des six mesures de l'ensemble de l'essai (M4) que la mesure de la première demi-heure (M1).

- M1 est plus près de M4 3 fois
- M2 est plus près de M4 6 fois.

Une heure semble donc une durée nécessaire d'examen du débit de base.

Assez souvent (8 fois sur 10), M3 est plus élevée que M4. Il n'y a pas de baisse notable du débit biliaire au cours de l'essai, dans nos conditions expérimentales. M3 est d'ailleurs toujours voisine de M4.

Par rapport au débit de base M2, les quatre dernières mesures (M3) sont le plus souvent d'une valeur plus grande (9 fois sur 10) mais toujours de très peu : toujours moins de 10 %. Dans ces conditions, une élévation de 20 % d'une mesure demi-horaire par rapport au débit de base nous paraît comme limite inférieure de la réponse positive après essai d'un produit.

σ - Expression chiffrée de la réponse :

Soit :

A = Pourcentage d'animaux ayant donné une élévation du débit biliaire de plus de 20 % (quand 8 rats sont dans ce cas, A = 1).

B = Pourcentage d'élévation moyenne de la cholérèse après traitement, en comptant seulement les valeurs au-dessus de $\pm 20 \%$, seuil significatif.

C = Durée en heures de la réponse significative (au-dessus de 20% d'élévation de la cholérèse de base).

L'activité cholérétique du produit pourra être représentée par :

$$\frac{A \times B \times C}{}$$

k) Applications - Solvants - Etalons - Choix du coefficient significatif :

- Les dix résultats précédents montrent que les solutions aqueuses alcalines employées (soude décinormale) n'ont pas d'effet cholérétique.
- Le propylène glycol, à la dose de 1 ml pour 200 g de poids vif, donne les valeurs suivantes :

$$A \times B \times C = 0,66 \times 24 \times 0,5 = 8$$

- La suspension de gomme arabique à 3% dans l'eau distillée, à raison de 1 ml/200 g augmente de 8% le débit biliaire, valeur inférieure au seuil significatif.
- Le déhydrocholate de sodium, à 50 mg/kg dans 1 ml d'eau pour 200 g de poids corporel, donne les valeurs suivantes :

$$1 \times 73 \times 1 = \underline{73}$$

- Pour la para hydroxy salicylanilide (Driol) :

$$1 \times 68,6 \times 1 = \underline{68,6}$$

- Pour le cyclohexylbutyrate de sodium (Hébucol), nous avons :

$$1 \times 69,5 \times 2 = \underline{139}$$

Les coefficients de ces trois derniers cholérétiques reconnus sont élevés et très différents des valeurs relevées sur les excipients.

Nous pouvons maintenant choisir un coefficient cholérétique (A x B x C) significatif, tel que tout produit ayant donné une valeur égale ou supérieure pourra être considéré comme cholérétique dans nos conditions d'essai.

En prenant : 20 ‰ pour B
 1 pour A
 1 pour C

Nous avons :

$$A \times B \times C = 1 \times 20 \times 1 = \underline{20}$$

Le coefficient 20 correspond, entre autres, à une substance donnant sur 8 rats (A = 1) une élévation de la cholérèse de 20 ‰ (B = 20 - seuil significatif précédemment retenu), pendant une heure ; ou donnant 40 ‰ d'hypercholérèse dans la première demi-heure suivant le traitement.

Tout coefficient au-dessous de 20 caractérisera un produit inactif.

Tout coefficient au-dessus de 20 caractérisera un produit actif.

- . Aucun des solvants n'approche de cette valeur seuil.
- . Les variations spontanées conduisent à des valeurs très éloignées de ce coefficient.
- . Les cholérétiques reconnus sont largement classés comme positifs.

Un tel classement d'activité cholérétique nous permettra de définir un seuil d'activité pour une dose standard et de donner un ordre de grandeur de l'importance de la réponse, conduisant à un premier classement des corps testés.

B - En manière de conclusion, description succincte de la méthode d'étude employée -

Lot de 8 rats mâles Wistar, de même élevage, pesant 200 g environ, acclimatés au laboratoire, maintenus à un régime standard, avec boisson à volonté et ambiance thermostatée ($22^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}$).

Mise à la diète hydrique 18 h avant l'essai. Anesthésie au mébubarbital : 45 mg/kg I.P. Mise sur table chauffante (38°C). Laparotomie médiane, canulation du cholédoque avec un cathéter de 1 mm de diamètre extérieur.

Débit de base relevé dans des tubes gradués en μl , toutes les demi-heures pendant une heure.

Traitement par injection dans la première anse duodénale, d'une dose standard de 50 mg/kg de chaque produit essayé, généralement en solution aqueuse alcaline (pH 8,5 / 9) - volume 1 ml pour 200 g de poids vif. Ligature de l'intestin au niveau du pylore. Autres solvants : propylène glycol ou solution gommeuse à 3 %, même volume.

Durée de l'essai : 2 heures après l'injection duodénale, soit : deux relevés de débit avant, et quatre relevés après le traitement.

III - ACTIVITE CHOLERETIQUE DE QUELQUES

ANTICOAGULANTS CONNUS

Le tableau 28 résume les résultats obtenus avec les produits qui peuvent être dissous en milieu alcalin (solution à pH 8,5 / 9).

L'effet cholérétique éventuel du solvant est rappelé ici pour mémoire.

Ce problème a été étudié plus en détail dans le paragraphe II (Méthodes d'études).

Tableau 28

Activité cholérétique d'anticoagulants connus
en solution alcaline

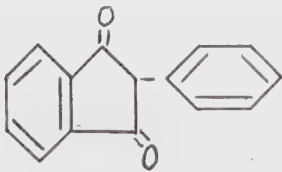
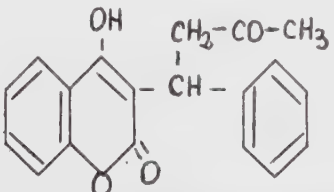
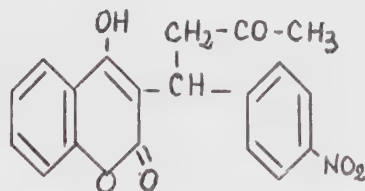
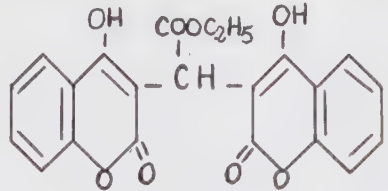
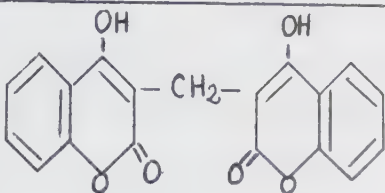
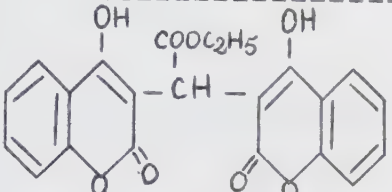
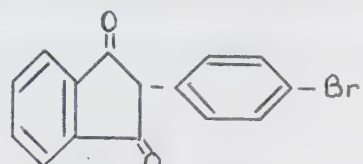
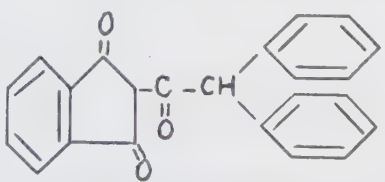
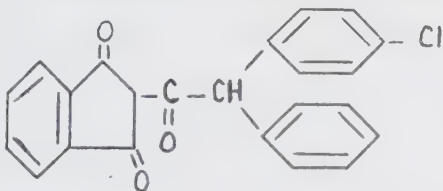
Produit	Formule	Activité anticoagulante sur le lapin	Activité cholérétique sur le rat A x B x C
Phénindione		+	0,87x38x1,5 = <u>50</u>
Warfarine		+	1x25x1 = <u>25</u>
Acénocouma- rine		+	1x48x2 = <u>96</u>
Biscoumacé- tate d'éthyl		+	0
Solvant alcalin	Volume : 1 ml/200 g	non	0

Tableau 29

Activité cholérétique d'anticoagulants connus
solubilisés dans le propylène glycol

Produit	Formule	Activité anticoagulante sur le lapin	Activité cholérétique sur le rat A x B x C
Dicoumarol		+	$1 \times 34 \times 1,5 =$ <u>51</u>
Biscoumacé- tate d'éthyl		+	$0,66 \times 34 \times 0,5 =$ <u>8</u>
Parabromo- phénindione n° 35		+	$0,87 \times 27 \times 2 =$ <u>46</u>
(Diphényl acétyl) 2 indane dione 1,3 (Diphacinone)		+	$1 \times 29 \times 2$ <u>58</u>
Parachloro phényl 1'phé- nyl 1' acétyl2 indane dione 1,3		+	$0,75 \times 2,39 \times 0,5 =$ <u>9</u>
Solvant propylène glycol	1 ml/200 g	non	$0,66 \times 24 \times 0,5$ <u>8</u>

L'examen de ces deux tableaux montre qu'il existe des cholérétiques dans la série des coumarines, des indane diones 1,3 et des acyl indane diones 1,3. Cette activité pharmacologique est beaucoup plus répandue que le pouvoir anti-inflammatoire. Les anticoagulants utilisés ne sont cependant pas tous actifs : le biscoumacétate d'éthyl, aussi bien en solution alcaline qu'au sein du propylène glycol, est inefficace. Dans nos conditions d'essai, rappelons que le déhydrocholate de sodium à 50 mg/kg, par voie duodénale, donne la réponse suivante :

$$1 \times 73 \times 1 = 73$$

ce qui classe l'activité de certains coumariniques au niveau de celle de ce sel biliaire. Il devient donc très intéressant de rechercher, dans des structures voisines d'activité inconnue, une dissociation éventuelle des effets cholérétiques et anticoagulants.

IV - RECHERCHE D'UNE REPONSE HYPERCHOLERETIQUE

PARMI LES MOLECULES NOUVELLES

Nos résultats sont groupés par famille chimique.

Nous n'avons pas développé nos recherches dans le groupe des flavones ; ce champ d'action a été largement exploré par divers auteurs (cf. références en tête de ce chapitre). Nous orientons nos recherches successivement dans les α pyrones, coumarines, hydroxy coumarines (surtout les hydroxy 4 coumarines et les hydroxy 7 coumarines), aryl 2 indane diones 1,3 et acyl 2 indane diones 1,3. Certains des corps étudiés dans ce chapitre ont déjà fait l'objet d'une recherche dans le domaine anti-inflammatoire.

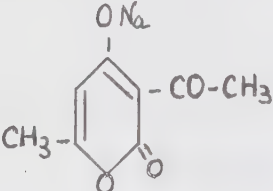
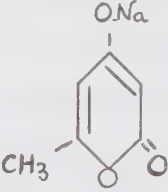
Il n'a pas été possible de conduire l'ensemble de ces essais anti-inflammatoires et cholérétiques, sur la totalité des substances ; en raison du manque de produit et de l'apport de structures nouvelles en vue de rechercher l'activité cholérétique maxima dans de nouvelles directions.

Les solvants employés ont été définis plus haut et sont rappelés pour chaque formule essayée. Notre étude est conduite très souvent sur des molécules comportant des groupements phénoliques, la solution est faite la plupart du temps en milieu alcalin dans la soude décinormale. Le pH des solutions ne dépasse alors jamais 9. Les solutions ainsi préparées sont utilisées extemporanément.

A - DERIVES DES ALPHA PYRONES -

Tableau 30

Activité cholérétique et anticoagulante d'alpha pyrones

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
α pyrones	54 eau		non	<u>68,6</u> /
	5 eau		non	10,5

Contrairement aux résultats consignés dans le précédent chapitre montrant l'absence d'activité anti-inflammatoire des α pyrones, nous constatons ici la présence d'un effet cholérétique. Le dérivé n° 54 possède, selon les critères précédemment fixés, une activité significative. Il n'est pas anticoagulant. Il paraît donc possible de développer dans la série un effet cholérétique non entaché d'effet anticoagulant. Cette dissociation n'avait pu être mise en évidence pour le couple anti-inflammatoire / anticoagulant.

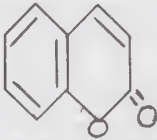
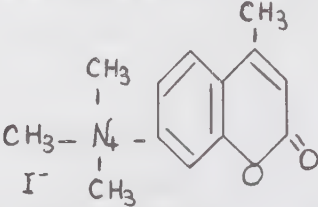
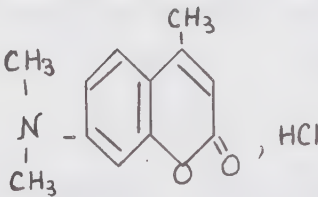
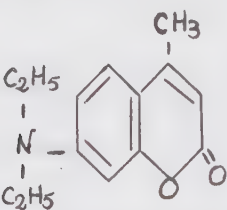
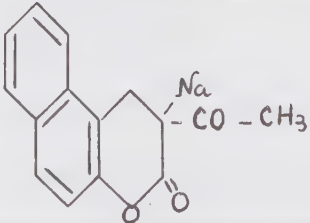
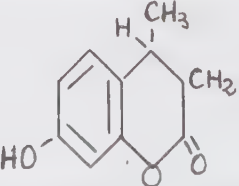
La présence d'une chaîne cétonique en 3 semble développer l'hypercholérèse. Cependant, ces résultats trop peu nombreux n'ont qu'une valeur indicative dans le domaine des relations structure / activité.

B - COUMARINES ET CORPS VOISINS -

Il s'agit essentiellement de coumarines non hydroxylées ou dont la double liaison en 3 - 4 est saturée.

Tableau 31

Activité cholérétique et anticoagulante de coumarines

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Coumarines	7 eau gommeuse		non	<u>70</u>
	55 eau		non	<u>80</u>
	57 eau		non	0
	8 eau		non	14
Coumarines saturées en 3 et 4	58 eau		non	0
	59 Soude N/10		non	11

Il existe des cholérétiques dans cette série. Le plus simple, le n° 7, a une activité de l'ordre de celle du déhydrocholate de sodium. Dans le cas du composé n° 55, la iodométhylation fait apparaître l'activité, la base ternaire correspondante (n° 57) en étant complètement dépourvue. Notons au passage que cette constatation ne semble pas avoir été signalée par les auteurs. L'hydrogénation de la double liaison en 3 - 4 (n° 58 et n° 59) conduit au même résultat négatif.

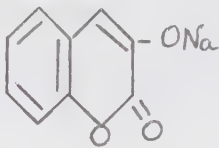
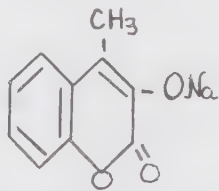
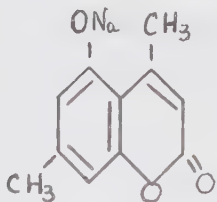
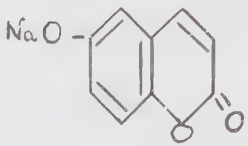
Les corps n° 7 et n° 55 sont cholérétiques et non anticoagulants : l'indépendance mutuelle des deux activités se confirme.

C - COUMARINES MONO HYDROXYLEES HORS LES

HYDROXY 4 COUMARINES -

Tableau 32

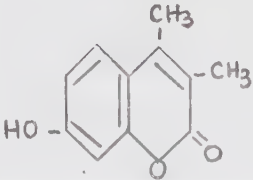
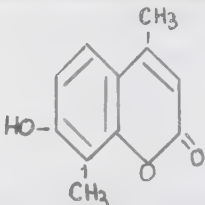
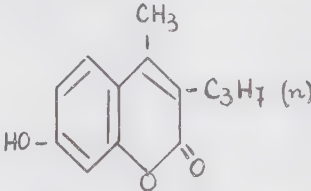
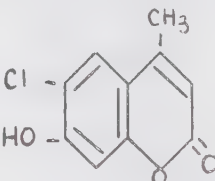
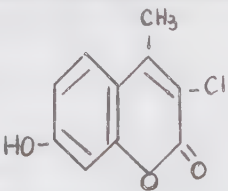
Activité cholérétique et anticoagulante des hydroxy coumarines
(hors les hydroxy 4 coumarines)

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante:	Activité cholérétique A x B x C
Hydroxy 3 coumarines	9 eau		non	<u>56</u> /
	60 eau		non	<u>47</u> /
Hydroxy 5 coumarines	10 eau		non	0
Hydroxy 6 coumarines	61 eau		non	0

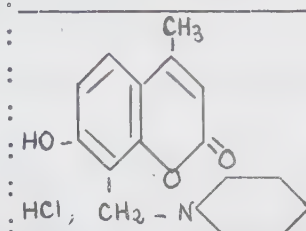
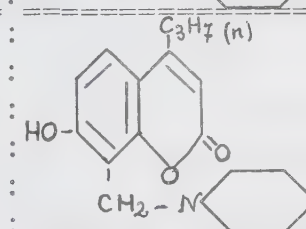
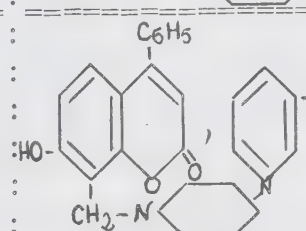
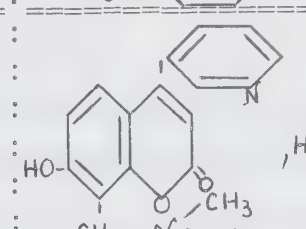
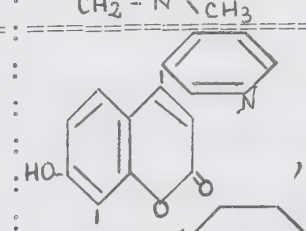
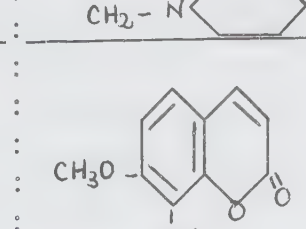
Activité cholérétique et anticoagulante des hydroxy coumarines
(hors les hydroxy 4 coumarines)
(suite)

Groupe		N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Hydroxy 7 Coumarines Monosubstituées	substitution alkyl ou aryl	62 Soude N/10		non	<u>53</u> /
		11 Soude N/10		0	<u>137</u> /
		63 Soude N/10		non	<u>20</u> /
		12 Soude N/10		non	<u>38</u> /
		64 Soude N/10		non	0
		65 Soude N/10		non	18
	substitutions diverses	66 Soude N/10		non	0
		67 Soude N/10		non	<u>69</u> /
		68 eau		non	0
		69 Soude N/10		non	<u>39</u> /

Activité cholérétique et anticoagulante des hydroxy coumarines
(hors les hydroxy 4 coumarines)
(suite)

Groupe		N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Hydroxy 7 Coumarines	Disubstituées	70 Soude N/10		non	<u>51</u> /
		71 Soude N/10		non	16
		72 Soude N/10		non	<u>81</u> /
	alkyl plus	73 Soude N/10		non	<u>60</u> /
		74 Soude N/10		non	<u>33</u> /
	halogène				

Activité cholérétique et anticoagulante des hydroxy coumarines
(hors les hydroxy 4 coumarines)
(suite et fin)

Groupe		N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Disubstituées	Bases de Mannich	75		non	<u>22</u>
		13		non	<u>24</u>
		15		non	15
		56		non	0
		76		non	<u>26</u>
		hydroxy 8 coumarines		78	

L'hydroxylation sur les sommets 3 - 5 - 6 - 7 - 8 supprime toute activité anticoagulante. Par contre, de nombreux corps sont cholérétiques dans la série. L'hydroxylation en 3 confère une bonne activité (n° 9 et n° 60). L'hydroxylation en 5, 6 et 8 semble peu intéressante.

Au contraire, il existe de bonnes réponses cholérétiques parmi les hydroxy 7 coumarines, plus abondamment étudiées, il est vrai. Le n° 62 est l'ombelliférone elle-même. Les monosubstitutions supplémentaires de type alkyl augmentent la réponse cholérétique. L'addition du radical méthyl en 4 (n° 11) semble beaucoup plus intéressante que celle du norpropyl (n° 38). Le radical phényl dans cette même position semble défavorable (n° 65). Les substitutions en 5 et en 8 (n° 63 et n° 64) ont le même effet. Le n° 11 semble se détacher avec un coefficient de 137. Les autres substitutions avec des chaînes oxygénées ne confèrent pas une grande activité aux molécules. Cependant, la cétone juxtanucléaire (n° 67) donne une réponse importante. L'amide est complètement inactive (n° 68) ce que laissait prévoir son insolubilité totale.

Les disubstitutions de ces hydroxy 7 coumarines conduisent à des résultats pharmacologiques intéressants :

- Dans les dialkyl dérivés, la propyl 3 méthyl 4 hydroxy 7 coumarine (n° 72) a un effet supérieur à celui des dérivés diméthyl 3,4 (n° 70) et diméthyl 7,8 (n° 71). Mais aucun n'atteint l'activité du monométhylé en 4 (n° 11)

- L'halogénéation supplémentaire ne semble pas favorable.
La méthyl 4 chloro 6 hydroxy 7 coumarine (n° 73) et la méthyl 4 chloro 3 hydroxy 7 coumarine (n° 74) ont un coefficient respectif de 60 et 33, tous deux inférieurs à celui de leur congénère non halogéné (n° 11).
- L'alourdissement de la molécule par une chaîne basique en 8 n'est pas favorable. La comparaison des coefficients cholérétiques des composés :
 - . n° 11 et n° 75
 - . n° 12 et n° 13
 - . n° 15 et n° 65

illustre cette constatation. Ces bases de Mannich ont généralement un petit effet cholérétique.

Finalement, les réponses cholérétiques dans ce groupe sont très diverses, parfois très fortes. L'alourdissement du noyau et des chaînes latérales est plutôt défavorable. La position hydroxy 7 semble la plus féconde. Le corps n° 11, ou méthyl 4 ombelliférone, semble très actif.

D - HYDROXY 4 COUMARINES -

Ce groupe est un des plus intéressants pour nous car c'est le seul où peut apparaître, dans les coumarines, une activité anticoagulante.

Tableau 33

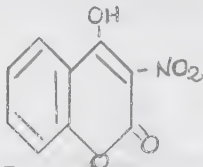
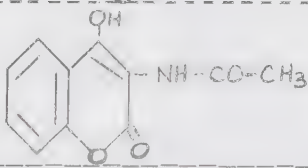
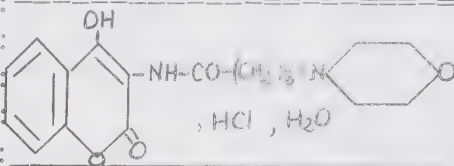
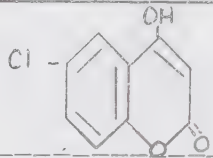
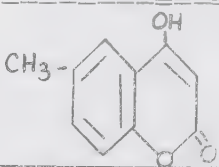
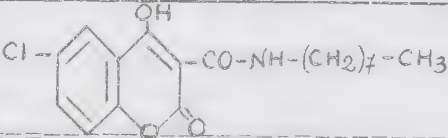
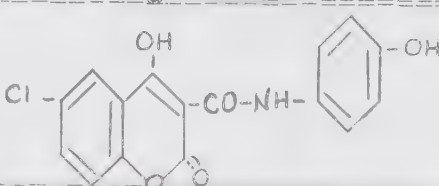
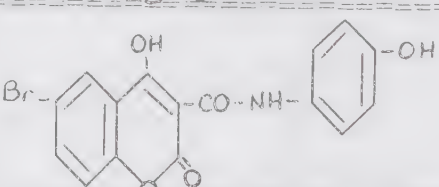
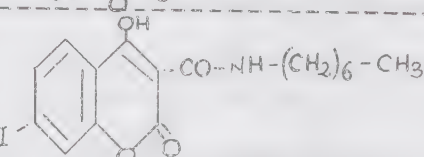
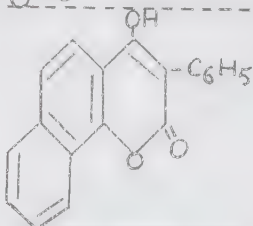
Activité cholérétique et anticoagulante des hydroxy 4 coumarines

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité
				cholérétique A x B x C
	16 Soude N/10		non	<u>103</u>
3 en Substitution	79 Soude N/10		non	0
	80 Soude N/10		non	0
	81 Soude N/10		non	<u>30,6</u>
	82 Soude N/10		non	<u>44</u>
	17 Soude N/10		non	0
	83 eau		non	0
	19 eau		0	0
	84 eau		non	0
	85 eau		non	<u>23</u>

Activité cholérétique et anticoagulante des hydroxy 4 coumarines
(suite)

Substitution en 3

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Cétones	86 Soude N/10		non	<u>61</u>
	87 Soude N/10		non	0
	88 Soude N/10		<u>+</u>	<u>23</u>
	18 Soude N/10		<u>+</u>	<u>43</u>
	89 Soude N/10		<u>+</u>	0
Ester	90 Soude N/10		non	0
Alkyl	91 Soude N/10		non	<u>127</u>
Aryl	92 Soude N/10		<u>+</u>	<u>62</u>
Alkylaryl	26 Soude N/10		<u>+</u>	<u>26</u>
Halogène	93 Soude N/10		<u>oui</u>	<u>37</u>

Groupe		N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique $A \times B \times C$
Substitution en 3	Nitro	94 Soude N/10		non	0
	Amides	95 Soude N/10		non	0
		96 eau	 , HCl, H ₂ O	non	0
Substitution en 6		97 Soude N/10		non	<u>43</u>
		98 Soude N/10		non	<u>28</u>
Substitution en 3 et un autre sommet	Substitution en 3 et 6	24 Soude N/10		non	0
		99 Soude N/10		non	12
		25 Soude N/10		non	14
	Substitution en 3 et 7	100 Soude N/10		non	<u>21</u>
	Substitution en 3 et 7 / 8	101 Soude N/10		non	<u>75</u>

Le chimiste nous a fourni, parmi les hydroxy 4 coumarines, un maximum de substances ayant une substitution sur le sommet n° 3. Nous avons pu étudier un large échantillonnage de diverses fonctions possibles, capables de modifier les réponses liées à la présence de l'hydroxyle en 4, particulièrement intéressante pour maintenir un effet anticoagulant en présence ou en absence d'un pouvoir cholérétique.

L'examen du précédent tableau (tableau 33) conduit aux constatations suivantes :

- L'hydroxy 4 coumarine elle-même (n° 16) est un bon cholérétique.
- La substitution la plus simple donne le produit le plus actif : n° 91 ou méthyl 3 hydroxy 4 coumarine, avec un coefficient de 127. Il faut noter l'importance de cette substitution alkyl dans la recherche du meilleur effet cholérétique. Le résultat obtenu avec le corps n° 91 est à rapprocher de celui obtenu avec :
 - . le corps n° 54 (tableau 30)
 - . le corps n° 55 (tableau 31)
 - . les corps n° 11 et 72 (tableau 32).

Tout alourdissement de la molécule conduit à un abaissement de la réponse hépatique.

- . Les carboxamides 3 n'ont qu'une faible activité cholérétique, quelle que soit la longueur de la chaîne.

. Les dérivés cétoniques en 3 sont les plus intéressants : parmi eux se recrutent, dans les hydroxy 4 coumarines, les plus puissants anticoagulants. Effectivement, nous avons retrouvé un puissant effet antivitaminique K pour les dérivés n° 88 - 18 et 89. Les deux premiers sont cholérétiques, contrairement au dernier. Comme le n° 86 est un bon cholérétique et non anticoagulant, et le n° 87, un dérivé totalement dépourvu des deux activités recherchées, on voit qu'il existe bien une indépendance totale des effets anticoagulant et cholérétique.

Le seul ester étudié n'est pas cholérétique (n° 90).

Nous retrouvons avec les corps n° 92 et 26, deux anticoagulants dont nous avons vérifié l'activité sur le lapin. Ces deux corps sont cholérétiques. Notons que le dérivé arylique en 3 (n° 92) est moins actif que son homologue alkylé (n° 91).

La même conclusion peut être tirée de l'examen des résultats cholérétiques obtenus avec les corps n° 93 et 94, comportant un substituant en 3 à caractère électronégatif. D'après les données de la littérature, seul le n° 93 est anticoagulant, encore que faiblement.

Les amides fixées sur le troisième sommet n'ont plus aucune activité pharmacologique.

- Les hydroxy 4 coumarines ayant un substituant placé sur un autre sommet que le 3, ou multisubstituées sont des cholérétiques parfois puissants (n° 101) mais non anticoagulants.

Au total, on note dans cette série l'indépendance complète des deux activités pharmacologiques recherchées contrairement à ce que nous avons pu observer au chapitre II sur le couplage des activités anticoagulante et anti-inflammatoire.

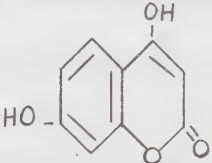
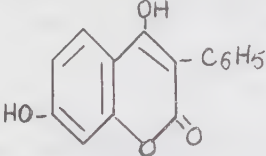
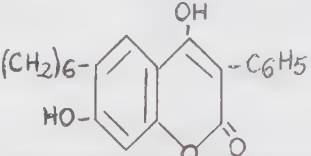
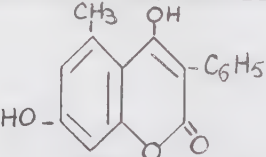
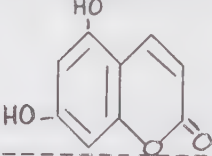
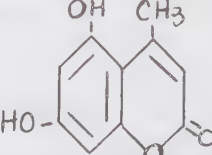
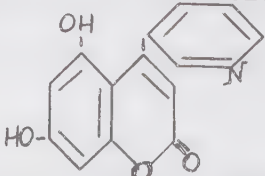
Ici, tous les cas sont possibles, par exemple :

- les corps n° 91, 16 et 101 ne sont pas anticoagulants mais cholérétiques,
- les corps n° 19, 95 et 24 ne sont ni anticoagulants ni cholérétiques,
- les corps n° 18 et 92 sont à la fois anticoagulants et cholérétiques,
- le corps n° 89 est anticoagulant mais non cholérétique.

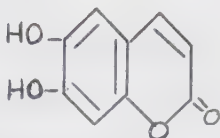
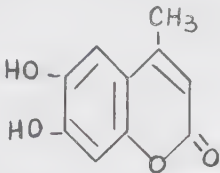
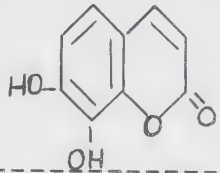
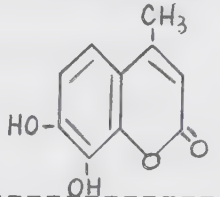
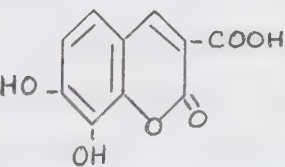
E - DIHYDROXY COUMARINES -

Tableau 34

Activité cholérétique et anticoagulante de quelques dihydroxy coumarines

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Dihydroxy 4-7 coumarines	102 Soude N/10		non	<u>62</u> /
	27 Soude N/10		non	0
	103 Soude N/10		non	<u>82</u> /
	104 Soude N/10		non	0
Dihydroxy 5-7 coumarines	105 Soude N/10		non	0
	106 Soude N/10		non	18
	107 Soude N/10		non	0

Activité cholérétique et anticoagulante de quelques dihydroxy coumarines
(suite)

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Dihydroxy 6-7 coumarines	108 Soude N/10		non	<u>137</u>
	29 Soude N/10		non	11
Dihydroxy 7-8 coumarines	109 Soude N/10		non	0
	110 Soude N/10		non	9
	111 Soude N/10		0	0

Dans cette série, aucune substance n'est anticoagulante. Quelques dérivés sont cholérétiques. Le plus actif est le dihydroxy 6,7 coumarine : c'est l'esculétine. On vérifie ici l'importance de l'hydroxylation en position 7.

Dans les dihydroxy 4,7 coumarines, il est clair que le corps de base (n° 102) est actif, que l'homologue phénylé en 3 est inactif (n° 27), que l'addition d'un cyclohexyl en 6 conduit à un puissant cholérétique (n° 103), alors que l'addition d'un méthyl en 5 conduit à un corps inactif (n° 104). En comparant les corps n° 103 et n° 104, il semble que la substitution alkyl, la plus lourde, conduise à un grand accroissement de la réponse biologique.

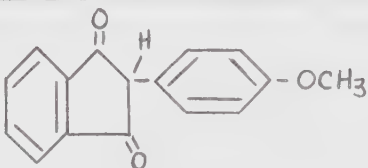
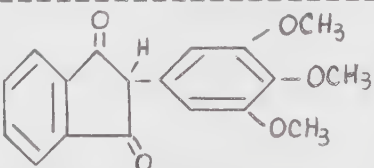
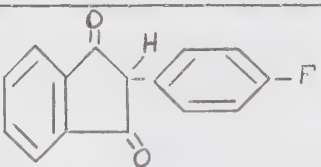
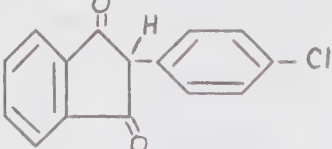
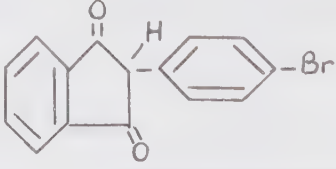
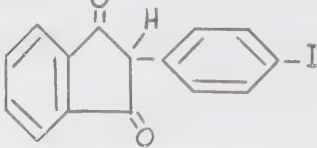
Il faut signaler la grande efficacité du dérivé n° 108 (coefficient : 137). L'hydroxylation en 7 est bien présente et la double substitution contiguë à caractère phénolique confère une bonne efficacité. Le corps n° 29 est le dérivé méthylé en 4 du précédent ; mais c'est aussi la méthyl 4 ombelliférone (n° 11 - tableau 32), alourdie d'un hydroxyle en 6. Rappelons que le corps n° 11 est aussi actif que le dérivé n° 108. Le dérivé n° 29 est en quelque sorte la conjonction des substitutions les plus intéressantes des dérivés n° 11 et 108. Il est pourtant non cholérétique lui-même, contre toute attente. Enfin, le dérivé n° 110, qui est aussi une méthyl 4 ombelliférone, mais hydroxylée en 8, n'est pas cholérétique.

Ces deux derniers exemples confirment une règle fréquemment retrouvée en pharmacologie. L'accumulation des substituants les plus intéressants conduit rarement au meilleur résultat biologique : l'alourdissement de la molécule, les empêchements stériques qui en résultent, diminuent l'absorption de la drogue, modifient les voies du métabolisme attendu, changent la nature des catabolites et leurs voies d'élimination : ce dernier point, dans le cas de la cholérèse, peut enlever tout intérêt au corps synthétisé.

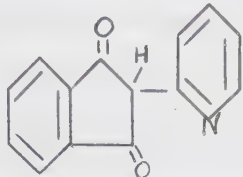
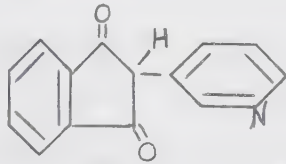
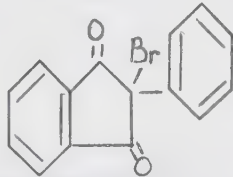
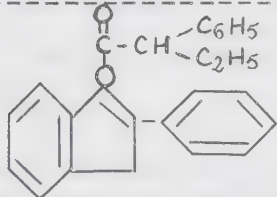
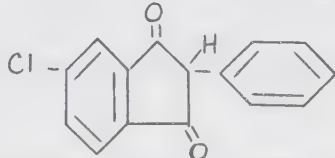
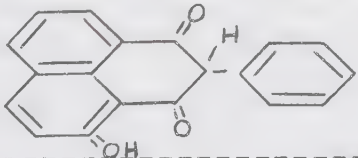
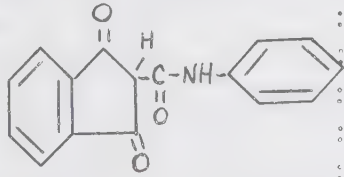
F - ARYL 2 INDANE DIONES 1,3 ET CORPS VOISINS -

Tableau 35

Activité cholérétique et anticoagulante de
quelques aryl 2 indane diones 1,3 et corps voisins

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Indanes diones dérivés para méthoxylés	31 Soude N/10		$\frac{+}{/}$ *	$\frac{97}{/}$
	32 Soude N/10		0	$\frac{67}{/}$
Indanes diones dérivés para halogénés	33 Soude N/10		$\frac{+}{/}$	$\frac{51}{/}$
	34 Soude N/10		$\frac{+}{/}$	11
	35 Soude N/10		$\frac{+}{/}$	$\frac{46}{/}$
	36 Soude N/10		$\frac{+}{/}$	$\frac{32}{/}$

Activité cholérétique et anticoagulante de
quelques aryl 2 indane diones 1,3 et corps voisins
(suite)

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
Pyridyl indane diones	112 Soude N/10		0	10
	37 Soude N/10		0	10
Blocage biolo- giquement stable de la tautomérisation	41 eau gommeuse		* $\pm$	12
	43 eau gommeuse		* $\pm$	0
Divers	38 Soude N/10		* $\pm$	0
	53 Soude N/10		0	$\overline{30}$
	113 eau gommeuse		0	$\overline{22}$

* Activité anticoagulante seulement retrouvée avec 300 mg/kg du produit.

Dans cette série coexistent anticoagulants et cholérétiques.

Rappelons que la phényl 2 indane dione 1,3 elle-même a un coefficient cholérétique de 50. Les substitutions méthoxylées sur le phényl 2 semblent favoriser la réponse hépatique. Le dérivé n° 32 présente une dissociation des effets cholérétique et anticoagulant. L'examen des résultats obtenus avec les dérivés halogénés en para sur le phényl en 2, dont les structures sont regroupées dans le tableau 35 (corps n° 33, 34, 35 et 36), montre que la réponse cholérétique ne semble pas dépendre du poids atomique de l'halogène ou de sa réactivité chimique. Le dérivé n° 34 est inactif. Tous les quatre sont, bien entendu, de bons anticoagulants. Les isostères de phénindione, comportant un pyridyl 2 en diverses positions (ortho : n° 112 - meta : n° 37) sont totalement inactifs dans les deux directions étudiées.

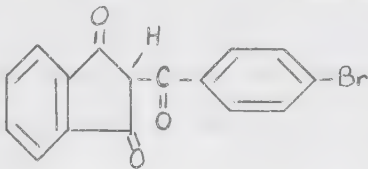
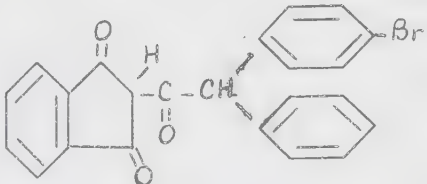
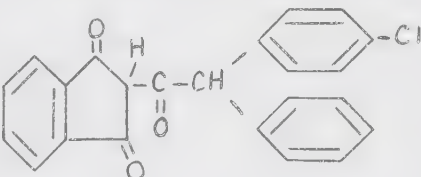
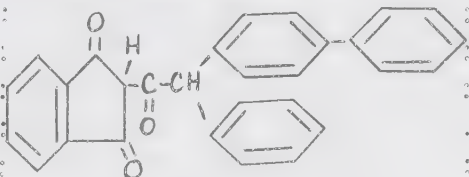
Lorsque le métabolisme des molécules (n° 41 - n° 43) rend possible une libération des formes tautomères, il existe une activité anticoagulante liminaire. Aucune activité cholérétique n'est décelée. Rappelons que l'effet antiphlogistique de ces corps se maintient (chapitre II). La charge du cycle benzénique du noyau indane (n° 38) diminue fortement l'effet hémorragipare et supprime l'activité cholérétique.

Au total, il existe ici encore, une dissociation complète des effets étudiés, avec une activité cholérétique plutôt plus faible que dans les hydroxy coumarines.

G - ACYL 2 INDANE DIONES 1,3 et BENZOYL 2 INDANE
DIONES 1,3 -

Tableau 36

Activité cholérétique et anticoagulante de
 quelques acyl 2 indane diones 1,3 et corps voisins

Groupe	N° solvant	Formule	Activité anticoagulante	Activité cholérétique A x B x C
	114		0	<u>62</u>
	eau gommeuse			
	49		<u>+</u>	0
	eau gommeuse			
	47		<u>+</u>	9
	eau gommeuse			
	115		<u>+</u>	0
	eau gommeuse			

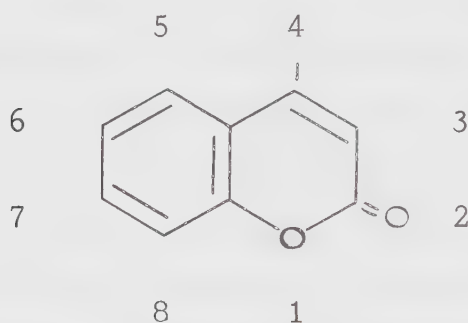
Ces corps se classent parmi les anticoagulants les plus puissants étudiés dans ce travail. Certains, tel le n° 47 ou le n° 49, ont une dose minimale anticoagulante inférieure au mg par kg de poids corporel chez le lapin. Ils ne sont pas, en général, cholérétiques, même à la dose standard choisie (50 mg/kg). Le corps n° 114 fait exception, mais c'est une benzoyl 2 indane dione 1,3 non anticoagulante. En quelque sorte, dans cette série et pour autant que le nombre de structures essayées puisse permettre d'avancer une conclusion, la séparation des deux effets pharmacologiques étudiés est totale. Notons par ailleurs le contraste entre la puissance de l'effet anticoagulant et la modestie de la réponse hépatique.

V - DISCUSSION DES RESULTATS

1°) Nos résultats expérimentaux nous autorisent à préciser quelques relations entre la structure des molécules étudiées et leur activité cholérétique. Les acyl 2 indane diones 1,3 examinées ne semblent pas avoir un effet cholérétique notable. Dans les indane diones, le dérivé le plus actif semble être le corps n° 31 ou para méthoxy phényl indane dione. Déjà en 1931, CHABROL, CHARONNAT et coll. - 429 - notaient que la méthylation des molécules ne gênait pas l'activité cholérétique. Ce dérivé n° 31 est un anticoagulant assez puissant. Au contraire, dans les coumarines se recrutent des cholérétiques dont l'activité est souvent égale ou supérieure à celle du déhydrocholate de sodium. La coumarine elle-même (n° 7) est active. Là encore, CHABROL et CHARONNAT - 426 - (loc.cit.) ont montré que la cholérèse est facilitée par la juxtaposition de deux noyaux. Les auteurs constatent qu'il n'est pas nécessaire que le second soit fermé. Ils notent que l'acide benzoïque a une activité inférieure à celle de l'acide cinnamique. Nos coumarines cholérétiques répondent exactement à ces critères. La chaîne lactonique est bien une chaîne fermée d'un acide hydroxy ciscinnamique.

Les modifications structurales, les substitutions des divers sommets de la coumarine conduisent-elles à un renforcement de l'activité ?

a) La présence de groupements hydroxylés semble d'une particulière importance, ce qui confirme les travaux cités par BIZARD et VANLERENBERGHE - 382 - (loc.cit.), indiquant que les composés les plus cholérétiques sont ceux qui comportent un groupement hydroxyle libre. Les conclusions de ces auteurs sont basées sur des études conduites autour des cycles du phénol, du naphthol, du phényl méthyl carbinol et du phényl glycol.



- L'hydroxylation en 4 est favorable (n° 6 - tableau 33). Toute addition supplémentaire est défavorable, sauf avec un substituant méthylé en 3 (n° 91 - tableau 33).
- L'hydroxylation du sommet n° 7 (ombelliférone) confère une activité accrue dans les dérivés n° 62, 11, 72 (tableau 32) et aussi dans le dérivé n° 103 (tableau 34) qui est porteur de deux groupements hydroxylés en 4 et en 7. Ces résultats rappellent ceux de CHABROL et CHARONNAT (1930) - 430 - qui montrent que, sur l'animal endormi, l'activité cholérétique augmente avec le nombre de fonctions phénol.

- Cependant, la double hydroxylation des sommets 7 et 5 supprime l'activité : corps n° 105, 106 et 107 (tableau 34). Celle des sommets 6 et 7 ne conduit pas à des résultats univoques : n° 108 très actif, n° 29 peu actif (tableau 34). Celle des sommets 7 et 8 est défavorable.

b) La présence d'un substituant alkyl sur divers sommets nuance aussi fortement la réponse biologique : avec un méthyl en 4 et un hydroxyl en 7, la réponse est très positive (n° 11 - tableau 33). Le même radical en 3 sur l'hydroxy 4 coumarine conduit au même résultat (n° 91 - tableau 33). L'alourdissement de la chaîne est nuisible. Le dérivé n° 12 : norpropyl 3 hydroxy 7 coumarine a une activité inférieure à celle de son congénère méthylé (n° 11 - tableau 32). Cette constatation infirme en partie les conclusions de BIZARD et VANLE-RENBURGHE - 382 - (loc.cit.) qui indiquent que la réponse cholérétique augmente avec le poids moléculaire des corps essayés. La fixation d'un alkyl en 8 sur l'hydroxy 7 coumarine supprime tout effet cholérétique (n° 64 - tableau 32).

D'ailleurs, la substitution du huitième sommet est toujours défavorable, par exemple pour les corps n° 56, 71, 75, 13, 76, 15, 64, 109, etc...

c) Les substitutions azotées semblent en général défavorables.

Les diverses tentatives d'introduction d'un ou plusieurs atomes d'azote sont regroupées ci-dessous, essentiellement parmi les corps les plus intéressants : les coumarines.

/ Azote juxta nucléaire ou sur la lactone /

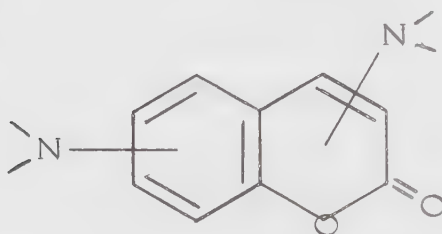
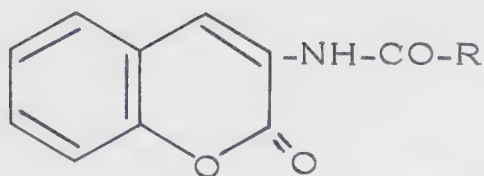
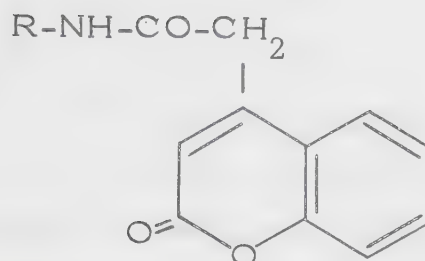


Tableau 37

N° du produit	N° du tableau	Coefficient cholérétique	Observations
55	31	<u>80</u>	ammonium quaternaire
57	31	0	amine tertiaire
8	31	14	amine tertiaire

Sauf pour le corps n° 55, les résultats sont très faibles.

/ Amides /

Type AType BTableau 38

N° du produit	N° du tableau	Coefficient cholérétique	Observations
95	33	0	Type A Acétamide
96	33	0	Type A Azote supplémentaire sur la chaîne en 3 (morpholine)
68	32	0	Type B

Il n'y a aucun produit actif dans cette série. Le corps n° 95 est l'acétamide correspondant à l'hydroxy 4 coumarine (n° 11). Cette amide a complètement perdu l'efficacité de son chef de file.

/ Carboxamides 3 /

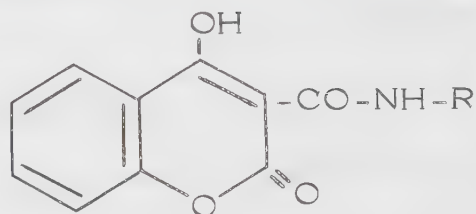


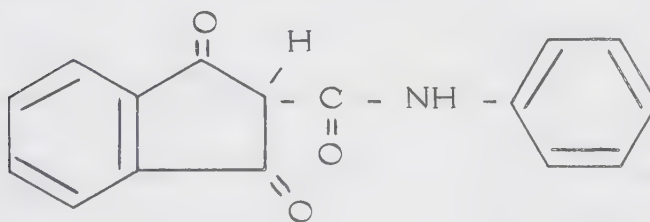
Tableau 39

N° du produit	N° du tableau	Coefficient cholérétique	R =
99	33	12	paraphénol
25	33	14	paraphénol
79	33	0	paraphénol
80	33	0	orthophénol
81	33	/ 30,6 /	ortho pyridine
82	33	/ 44 /	pipéridine
17	33	0	morpholine
24	33	0	chaîne octyle
100	33	/ 21 /	chaîne heptyle
19	33	0	diéthylaminoéthyl
83	33	0	dimorpholinoéthyl
84	33	0	dinorpropylaminobutyl
85	33		morpholinoéthyl

Nous n'avons pu étudier que celles dérivant des
hydroxy 4 coumarines.

L'ensemble de ces dérivés est dénué d'action. Les quelques cholérétiques (n° 81, 82 et 100) sont peu efficaces. Le corps n° 79 est la carboxamide correspondant à l'hydroxy 4 coumarine, elle-même très active (n° 16). Ce dérivé azoté a perdu tout pouvoir cholérétique. Certains corps étudiés ont une chaîne de type p.hydroxy phényl amido -, donc voisine du p.hydroxy salicyl anilide, corps utilisé comme cholérétique en thérapeutique. Les coumarines correspondantes ont perdu une grande partie de leur activité.

Le n° 113 (tableau 35) est une indane dione de structure voisine et dont l'activité cholérétique est aussi nulle.



Bases de MANNICH

Elles sont toutes fixées sur le huitième sommet des coumarines, sommet particulièrement réactif du fait de la proximité d'un hydroxyle phénolique. BOSCHETTI, MOLHO et coll. (1966) - 99 - ont précédemment démontré la position de cette chaîne amino méthyle.

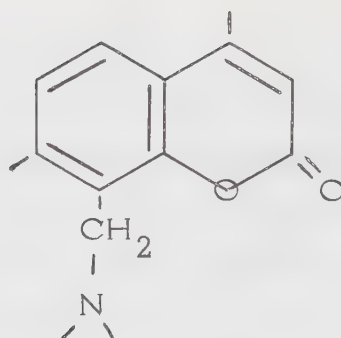


Tableau 40

N° du produit	N° du tableau	Coefficient cholérétique	Observations
56	32	0	β pyridyl en 3
75	32	<u>22,5</u>	Base de Mannich du composé n° 11 (tableau 32)
13	32	<u>24</u>	Base de Mannich du composé n° 12 (tableau 32)
76	32	<u>26</u>	Dérivé d'hydroxylation en 7 correspondant au composé voisin n° 56 (tableau 32)
15	32	15	Base de Mannich du composé n° 65 (tableau 32)

Comme il ressort des divers rapprochements indiqués dans ce tableau, la transformation des coumarines en leur base de Mannich correspondante est généralement défavorable à l'apparition d'une hypercholérèse.

/ Noyau azoté juxta nucléaire /

Tableau 41

N° du produit	N° du tableau	Coefficient cholérétique	Observations
56	31	0	pyridyl en 4 sur une cou- marine (base de Mannich en 8)
76	32	<u>/ 26 /</u>	pyridyl en 4 sur une hydroxy 7 coumarine
107	34	0	pyridyl en 4 sur une dihydroxy coumarine
112	35	10	α pyridyl sur indane dione 1,3
37	35	10	β pyridyl en 2 sur l'indane dione 1,3
41	35	12	c'est la phénindione dotée d'un brome en 2 sur l'indane dione

Là encore, la présence d'un azote, même intranucléaire, ne conduit pas à des activités cholérétiques notables.

d) D'autres modifications sont intéressantes :

L'halogénéation des molécules est en général néfaste : par exemple pour les n° 24, 99, 25 et 100 (tableau 33). Le rapprochement des résultats obtenus avec les corps n° 97 et 16 (tableau 33) et ceux des n° 73 et 11 (tableau 32) appuie ces conclusions, conclusions en accord avec celles de WILLIAMS et coll. (1965) - 432 -.

Pour ces auteurs, dans une série de substances antifoliques les dérivés halogénés sont moins cholérétiques que les non halogénés. D'autres substitutions à caractère électronégatif ont le même effet défavorable (corps nitré n° 94 - tableau 33). Rappelons que l'halogénéation du phényl des hydroxy 4 coumarines est aussi défavorable à l'activité anticoagulante.

L'hydrogénation de la double liaison 3 - 4 de la lactone détruit toute réponse biologique (n° 58 et 58 - tableau 31). Le corps n° 59 est le dérivé n° 11 ainsi réduit : les coefficients cholérétiques sont respectivement 11 et 137.

Finalement, une des substitutions les plus favorables reste l'hydroxylation, particulièrement en 7, ce qui attire l'attention sur le groupe des ombelliférones. La conjonction des substituants méthyl en 4 et hydroxyl en 7 donne une unité aux recherches poursuivies autour du corps n° 11 où nous trouvons les dérivés les plus intéressants.

2°) La séparation des activités anticoagulante et cholérétique semble très générale.

Les anticoagulants se recrutent seulement dans les hydroxy 4 coumarines, les indane diones 1,3 et les acyl 2 indane diones 1,3. Voici un rappel de l'activité cholérétique des anticoagulants d'activité confirmée.

Tableau 42

Activité cholérétique des anticoagulants étudiés

Groupe	N° du composé	Activité anticoagulante	Activité cholérétique
Dans les hydroxy 4 coumarines.	18	$\frac{+}{-}$	$\frac{23}{-}$
	26	$\frac{+}{-}$	$\frac{43}{-}$
	88	$\frac{+}{-}$	0
	89	$\frac{+}{-}$	$\frac{26}{-}$
	92	$\frac{+}{-}$	$\frac{62}{-}$
Dans les indane diones 1,3	31	$\frac{\pm}{-}$	$\frac{97}{-}$
	33	$\frac{+}{-}$	$\frac{51}{-}$
	34	$\frac{+}{-}$	11
	35	$\frac{+}{-}$	$\frac{46}{-}$
	36	$\frac{+}{-}$	$\frac{32,5}{-}$
	38	$\frac{\pm}{-}$	0
	41	$\frac{\pm}{-}$	12
	43	$\frac{\pm}{-}$	0
Dans les acyl 2 indane diones 1,3	47	$\frac{+}{-}$	9
	49	$\frac{+}{-}$	0
	115	$\frac{+}{-}$	0

Les cholérétiques ne sont localisés que dans les hydroxy 4 coumarines et les aryl 2 indane diones 1,3. Les cholérétiques anticoagulants les plus actifs se recrutent dans les indane diones 1,3. Rappelons que c'est le cas de phénindione.

D'un autre côté, nous pouvons rechercher l'activité anticoagulante des corps les plus cholérétiques selon nos critères (coefficient cholérétique aux environs de 100 ou au-dessus).

Tableau 43

Activité anticoagulante des cholérétiques les plus puissants
parmi les dérivés étudiés

Groupe	N° du composé	Activité anticoagulante	Activité cholérétique
Hydroxy 7 coumarine	11	/ 137 /	0
Hydroxy 7 coumarine	72	/ 81 /	0
Hydroxy 4 coumarine	16	/ 103 /	0
Hydroxy 4 coumarine	91	/ 127 /	0
Dihydroxy 6 - 7 coumarine	108	/ 137 /	0
Indane dione 1,3	31	/ 97 /	/ ± /

La majorité des corps les plus cholérétiques n'est pas anticoagulante. Il y a bien dissociation totale des deux effets. Cette constatation paraît plus explicable que celle de la non dissociation des activités anticoagulante et anti-inflammatoire. La sécrétion biliaire peut être influencée par de nombreux traitements médicamenteux. En particulier, l'excrétion biliaire du médicament lui-même favorise la biligénèse, comme le rappellent ROBELET et GUERRIN (1966) - 433 -. Rappelons qu'en 1943, ANNEGERS, SNAPP et IVY - 434 - ont aussi montré que le cinchophène est excrété dans la bile, ce qui explique son pouvoir cholérétique. La cholérèse augmente, sous l'influence de ce produit, chez l'homme et chez le chien et non chez le lapin. Or, on le retrouve dans la bile des deux premiers

et pas dans celle du dernier. Très souvent, l'excrétion hépatique a lieu après glycuco conjugaison, cette glande étant le siège principal de cette voie de détoxication. Il faut pour cela un stade antérieur d'hydroxylation de la molécule ou la présence d'un hydroxyle dans la molécule originale, toujours de type phénolique [WILLIAMS (1959) - 435 - 7]. De nombreuses coumarines testées ici sont des phénols dont le lieu d'excrétion préférentiel sera la bile.

Mais la biligénèse est un phénomène complexe. Les cholérétiques peuvent agir encore d'autres façons sur l'excrétion biliaire. CHENDEROVITCH (1963) - 436 - rappelle que les mécanismes réglant la quantité de bile (débit) sont indépendants de ceux qui fixent la qualité de la bile (quantités de substances spécifiques excrétées). L'ensemble du tube biliaire, jusqu'aux voies biliaires extrahépatiques, participe à la fabrication de la bile définitive. Nos coumarines et corps voisins interviennent très certainement en ces divers points et de façon probablement non univoque, ce qui explique la grande variété des niveaux de réponse excrétrice.

VI - CONCLUSIONS

- Dans les séries étudiées, l'activité cholérétique est assez répandue, beaucoup plus fréquente que l'activité anti-inflammatoire. Sur 114 substances étudiées, il y en a 50 dont le coefficient cholérétique est égal ou supérieur à 20, dont 7 avec un coefficient voisin de 100 ou supérieur. Ce pourcentage élevé de réponses positives paraît normal : très souvent, la réaction de détoxication médicamenteuse est, au premier chef, hépatique. La voie biliaire est la voie normale d'élimination d'un "cholérétique" ; le produit est éliminé sous forme de glycuco ou sulfo conjugués, ces conjugaisons prenant place au niveau d'hydroxyles phénoliques, dont sont pourvus la plupart de nos dérivés.
- Les cholérétiques les plus puissants se trouvent dans les coumarines, moins dans les aryl 2 indane diones 1,3, et très rarement dans les acyl 2 indane diones 1,3.
- Dans les coumarines, la présence d'hydroxyles sur la chaîne lactonique (surtout dans les hydroxy 4 coumarines) ou sur le noyau benzène (surtout dans les hydroxy 7 coumarines) semble très favorable. L'addition de substituants azotés est au contraire défavorable. Certaines localisations de substitutions sont toujours inhibitrices de la biligénèse : c'est particulièrement le cas du sommet n° 8 du noyau coumarinique.
- La dissociation des effets cholérétique et anticoagulant paraît certaine.

. Dans les coumarines anticoagulantes

il y a des substances :

{	cholérétiques	dicoumarol (tableau 31)
		acénocoumarine (tableau 30)
		n° 18 et n° 88 (tableau 33)
{	non cholérétiques	biscoumacétate d'éthyle (tableau 30)
		n° 89 (tableau 33)

. Dans les coumarines non anticoagulantes

il y a des substances :

{	cholérétiques	n° 7 (tableau 31), n° 11 (tableau 32)
{	non cholérétiques	n° 24 (tableau 33), n° 56 (tableau 31)

. Dans les aryl 2 indane diones 1,3 anticoagulantes

il y a des substances :

{	cholérétiques	phénindione (tableau 21)
		n° 31 et n° 35 (tableau 35)
{	non cholérétiques	n° 34, n° 41 et n° 43 (tableau 35)

. Dans les aryl 2 indane diones 1,3 non anticoagulantes :

il y a des substances :

{	cholérétiques	n° 32 (tableau 35)
{	non cholérétiques	n° 112 et n° 37 (tableau 35)

. Dans les acyl 2 indane diones 1,3 anticoagulantes

il y a des substances :

{	cholérétiques	diphacinone (tableau 31)
{	non cholérétiques	n° 49, n° 47 et n° 115 (tableau 36)

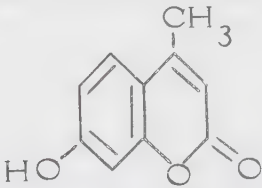
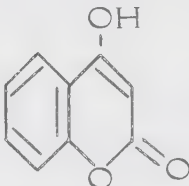
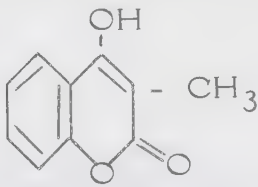
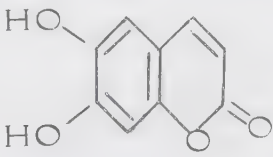
. Dans les acyl 2 indane diones 1,3 non anticoagulantes

il y a des substances :

{	cholérétiques	n° 114 (tableau 36).
---	---------------	----------------------

Cette dissociation complète des deux effets rend possible la découverte d'un cholérétique non entaché d'effet hémorragipare et utilisable en clinique, contrairement à ce qu'on a vu au chapitre II où l'activité anti-inflammatoire des indane diones n'a pu être dissociée de l'activité antivitaminique K.

- Parmi les cholérétiques non anticoagulants, voici les plus puissants

N°	Structure	Coefficient
11		137
16		103
91		127
108		137

Le corps n° 108 est l'esculétine, dont les propriétés capillaro-protectrices sont connues. Le dérivé n° 11 semble mériter une étude pharmacologique plus poussée, d'autant que des études de toxicité aiguë ont montré la meilleure tolérance du dérivé n° 11 par rapport au dérivé n° 108. Cette étude particulière sur la méthyl 4 ombelliférone fera l'objet du dernier chapitre de ce travail.

QUATRIEME CHAPITRE

ETUDE COMPLEMENTAIRE DU DERIVE N° 11 :

LA METHYL 4 HYDROXY 7 COUMARINE

OU

METHYL 4 OMBELLIFERONE

Nous étudierons le point des connaissances antérieures sur le corps n° 11, substance déjà décrite. Nous aborderons l'étude plus détaillée des effets cholérétiques de la drogue. Un autre développement sur ses effets spasmolytiques nous conduira à l'étude de son activité pharmacodynamique la plus originale : celle de ses effets sur la motricité oddienne. Dans une dernière partie, nous tenterons d'expliquer les raisons de ces activités cholérétiques et spasmolytiques.

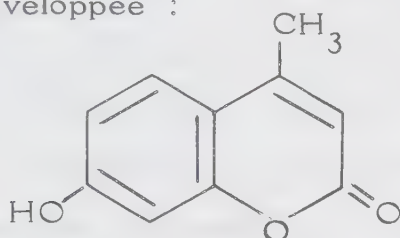
I - POINT DE NOS CONNAISSANCES SUR LA

METHYL 4 OMBELLIFERONE

Cette substance est connue, mais ses effets hépatiques sont ignorés. Elle n'a eu jusqu'à maintenant aucune utilisation thérapeutique.

1°) Caractères physicochimiques essentiels :

- Il s'agit de l'hydroxy 7 méthyl 4 oxo 2 benzopyrane 2 H 1.
- Poids moléculaire : 175
- Formule brute : $C_{10}H_8O_3$
- Formule développée :



- Point de fusion : 190° C (Banc Köfler).
- Le corps se présente en poudre microcristalline de couleur blanche, très peu soluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions alcalines. Il peut donner aussi un sel alcalin cristallisé de couleur jaune, soluble dans l'eau. Les solutions aqueuses alcalines sont fluorescentes. En utilisant un spectrophotomètre de fluorescence, il est possible de détecter la présence du produit jusqu'à la concentration de 0,01 µg/ml en solution alcaline.

2°) Point des connaissances antérieures :

a) Sur le plan chimique :

Il s'agit d'une ombelliférone qui est proche de composés naturels connus. L'ombelliférone elle-même peut être extraite de la piloselle (*Hieracium pilosella*) ; c'est aussi un constituant de certaines huiles essentielles, en particulier

celle de lavande. La première mention de la structure chimique de l'ombelliférone remonte au travail de TIEMAN et REINIER (1879) - 437 -. La synthèse de son dérivé méthylé en 4 a été décrite par VON PECHMAN - 438 -.

b) Sur le plan pharmacologique :

On relève quelques tentatives de recherches antérieures :

- Comme anthelmintique : MAHAL - 72 - (loc.cit.), TOSHIHIRA NAKABAYASHI - 23 - (loc.cit.) et TAKEO UIDA ne trouvent aucune activité intéressante.
- Comme antimicrobien : FRENCH et FRIEDLANDER (1949) - 439 - ne trouvent aucune activité à la méthyl 4 ombelliférone sur Mycobacterium tuberculosis in vitro. LESPAGNOL confirme ce résultat (1952) - 440 -. Rappelons que DUQUENOIS et GREIB - 46 - (loc.cit.) ayant montré une certaine efficacité de l'extrait de piloselle dans le traitement de la Fièvre de Malte, identifient l'ombelliférone comme principe actif antibrucellique. Ils sont conduits à essayer parmi d'autres coumarines, la méthyl 4 ombelliférone in vitro. Le produit est peu actif [GREIB et DUQUENOIS (1954) - 441 -] et n'a pas subi d'essai clinique en ce sens.
- HARNO et KITAGAWA - 33 - (loc.cit.) ne trouvent aucune activité hypnotique à ce dérivé.
- Dernière citation du produit avec GAZET du CHATELIER et coll. - 233 - (loc.cit.) qui précisent les effets vasculaires du produit à hautes doses. Par voie injectable,

il y aurait une hypotension de type ganglioplégique sur le chien endormi.

Au total, aucune des activités pharmacologiques explorées n'a semblé digne d'un développement expérimental ou clinique.

c) Sur le plan analytique :

La fluorescence intense du composé étudié retient l'attention des chercheurs. NASINI (1930) - 442 - utilise le produit comme indicateur de fluorescence dans les solutions foncées. PUKIREV (1934) - 443 - met à profit les variations de fluorescence de la méthyl 4 ombelliférone en fonction du pH pour proposer ce nouvel indicateur. PATZAK (1952) - 444 - présente une méthode de dosage polarographique du produit et de ses congénères. MEAD et SMITH (1965) - 445 - décrivent une méthode biologique de synthèse du glycuronide de la méthyl 4 ombelliférone afin d'utiliser le corps obtenu dans le titrage de la bêta-glycuronidase présente dans les sucs d'*Helix pomatia*.

Au total, l'activité cholérétique n'a jamais été mentionnée, et plus généralement, le tropisme hépatique du produit est resté inconnu.

I - ETUDE COMPLEMENTAIRE DE L'EFFET CHOLERETIQUE

DE LA METHYL 4 OMBELLIFERONE

L'essai conduit sur le rat et décrit au chapitre III a montré que ce produit est doué d'un effet cholérétique important. Notre propos est ici de confirmer les résultats sur une autre espèce animale : le chien, en précisant l'évolution des principaux constituants biliaires au cours de l'hypercholérèse.

1°) Méthodes :

Des chiens adultes, des deux sexes, pesant entre 10 et 20 kg, de race commune, à la diète hydrique depuis 18 heures, sont anesthésiés par injection intraveineuse de 20 mg/kg de méubarbital sodique. Une heure après, l'effet initial de cette dose d'attaque est relayé par la perfusion lente intraveineuse du barbiturique à raison de 7 mg par kg de poids corporel et par heure (pompe de perfusion Braun). Dans ces conditions, l'animal est à la limite d'anesthésie, son niveau de sommeil se contrôle facilement et les effets dépresseurs barbituriques sont réduits au minimum. Pour contrôler le niveau d'anesthésie, nous procédons tout au long de l'essai :

- à l'enregistrement du rythme et de l'amplitude respiratoire après fixation d'un pneumographe de Marey sur la cage thoracique,
- à l'enregistrement de la tension artérielle par canulation d'une des deux carotides communes, la pression étant mesurée par un manomètre de Ludwig,
- au contrôle, toutes les 30 minutes, du rythme cardiaque (par électrocardiographie en dérivation D_2) et de la température rectale.

Le volume injecté de solution anesthésique étant minime, l'animal est rehydraté régulièrement, par injection dans une fistule duodénale de 20 ml de sérum physiologique toutes les deux heures.

Une laparotomie haute sur la ligne médiane abdominale permet la mise à jour de la vésicule biliaire. La ligature du canal cystique élimine toute excrétion de bile vésiculaire dans les mesures ultérieures. La partie distale du cholédoque est découverte dans son trajet pancréatique et cathétérisée avec un tube en polyéthylène. Le débit biliaire est mesuré par recueil des quantités excrétées toutes les 30 minutes.

Après une période de latence où le débit se stabilise (1h 30 à 2 h), les produits essayés sont administrés par voie duodénale dans une fistule intestinale disposée à au-moins 10 cm au-dessous du cathétérisme cholédocien. Le volume standard de soluté médicamenteux est de 10 ml par kg de poids.

Nous essayons les produits suivants :

- Sel sodique du corps n° 11 soluble dans l'eau 100 mg/kg
- Etalons :
 - . Cyclohexylbutyrate de sodium 100 mg/kg
 - . Déhydrocholate de sodium 100 mg/kg
- Solvant : sérum physiologique 10 ml/kg

Les échantillons demi-horaires sont recueillis pendant au moins 3 heures après injection intraduodénale des corps essayés.

Nous procédons, sur chaque échantillon de bile, aux déterminations suivantes :

a) Valeur de l'extrait sec biliaire :

500 microlitres de chaque échantillon de bile sont disposés dans un verre de montre séché et taré. Après évaporation à poids constant dans une étuve à 60° C, les verres de montre sont pesés sur une balance au 1/10e de mg, en atmosphère déshydratée (stockage des capsules sous cloche à vide et présence de siccagel dans l'enceinte de la balance).

b) Dosage de la bilirubine :

Nous déterminons, dans chaque échantillon, la bilirubine totale en mettant à profit la réaction colorée fondamentale de diazotation telle qu'elle a été proposée par HIJMANS VAN DEN BERG (1934) - 446 -. Nous appliquons la technique décrite par MONNET (1961) - 447 - utilisant un réactif "révélateur" à base de caféine et de benzoate de sodium. Cette modification, d'abord proposée par BENARD et coll. (1949) - 448 -, évite le stade de précipitation des protéines, générateur de milieu trouble incompatible avec une mesure photométrique.

Réactifs utilisés :

- Solution de chlorure de sodium à 9 o/oo
- Solution d'acide sulfanilique (solution A)

. Acide sulfanilique	100 mg
. Acide chlorhydrique à 25 % en volume	1,5 ml
. Eau distillée q.s.p	100 ml

On dissout avec une partie de l'eau sous agitation mécanique. On complète ensuite à 100 ml.

- Solution de nitrite (solution B)
 - . Nitrite de sodium 50 mg
 - . Eau distillée q.s.p 10 ml
- Diazoréactif : par mélange au moment de l'emploi et dans l'ordre :
 - . Solution B 0,3 ml
 - . Solution A 10 ml

Ce réactif ne se conserve pas plus de 30 minutes selon notre propre expérience.

- Solution de caféine :
 - . Benzoate de sodium purifié 37,5 g
 - . Eau distillée environ 200 ml

On dissout sans chauffer par agitation mécanique. On ajoute :

- . Caféine pulvérisée au mortier 25 g
- . Acétate de sodium 62,5 g

Après dissolution, on complète à 500 ml avec de l'eau distillée. Cette solution doit être maintenue limpide par filtration.

- Réaction étalon de bilirubine.

Ictobrol Mérieux. On dissout le contenu du flacon dans 8 ml de soluté de chlorure de sodium à 9 o/oo. La concentration finale en bilirubine est portée sur le flacon (et voisine de 50 mg par litre).

Solution d'étalonnage :

Par dilution du réactif précédent avec du soluté isotonique de sodium, on obtient, sous un volume constant de 1 ml, des concentrations de 10 à 50 mg par litre.

Préparation de l'échantillon de bile :

Immédiatement après récupération de la bile, et compte tenu de sa concentration moyenne chez le chien, nous diluons les prélèvements au 1/5e dans le soluté chloruré isotonique. Afin de se retrouver dans les conditions de dosage d'une bilirubine sérique, nous diluons encore le dernier soluté avec une solution de protéines (albumine de bœuf : 50 g, dans 1 litre de soluté chloruré isotonique).

Etalonnage et dosage :

Nous préparons, pour chaque dilution de l'étalonnage et pour chaque solution à tester, deux tubes : T (témoin) et R (réaction).

	T	R
: Solution de bilirubine (étalonnage : ou prélèvement dilué)	: 0,4 ml	: 0,4 ml
: Solution d'acide sulfanilique	: 0,6 ml	: -
: Diazoréactif	: -	: 0,6 ml
: Mélange, puis addition de solution : de caféine	: 4 ml	: 4 ml

La coloration développée est lue au photomètre (Electro-synthèse) à une longueur d'onde comprise entre 530 et 560 mμ. Dans chaque cas, nous déduisons la densité optique obtenue avec le tube témoin, de celle obtenue avec le tube réaction. La coloration est stable entre 3 et 15 minutes. Les dilutions de la préparation étalon permettent la construction d'une courbe d'étalonnage. Nous en tirons la

concentration en bilirubine totale, en mg par litre, et la quantité de bilirubine excrétée dans la période demi-horaire étudiée, compte tenu du volume biliaire excrété dans le même temps.

2°) Résultats :

Nous donnons les résultats obtenus dans 10 essais :

- 1 chien témoin avec 10 ml/kg de solvant,
- 1 chien étalon avec 100 mg/kg de cyclohexylbutyrate de sodium
- 1 chien étalon avec 100 mg/kg de déhydrocholate de sodium
- 7 chiens avec 100 mg/kg de sel sodique du corps n° 11.

Les paramètres étudiés sont plus variables chez le chien que chez le rat. Les temps de base sont donc variables d'un animal à l'autre. Nous avons attendu, pour injecter le produit aux essais, une relative régularisation du débit biliaire spontané, sans dépasser toutefois 2 heures. Les résultats d'étalonnage figurent en un tableau pour chaque animal. Dans la série des chiens traités avec la méthyl 4 ombelliférone, un graphique récapitulatif donne une idée de la dispersion des mesures.

Tableau 44

Chien mâle - 20 kg - n° 1

Sérum physiologique amené à pH 8,5 par addition de soude diluée
10 ml/kg par voie duodénale

Temps	Température rectale en °C	Tension artérielle en cm de mercure	Débit biliaire en ml	Extrait sec en mg dans l'échantillon	Bilirubine totale en mg dans l'échantillon
30 mn	37	15	2,10	118,2	3,6
1 H	37	15	2	100,5	3,2
Sérum physiologique alcalin : 10 ml/kg I.D.					
1 H 30	37	15	2,4	110,3	3,6
2 H	37,5	14,5	2,2	98,5	2,6
2 H 30	37,5	14,5	2	97	2,9
3 H	37,5	15	1,8	94	2,2
3 H 30	37,5	15,5	2,3	130,3	3,7
4 H	37	15	3	180,2	4,1

Tableau 45

Chien femelle - 11,5 kg - n° 2

Cyclohexylbutyrate de sodium : 100 mg/kg I.D.

Temps	Température rectale en °C	Tension artérielle en cm de mercure	Débit biliaire en ml	Extrait sec en mg dans l'échantillon	Bilirubine totale en mg dans l'échantillon
30 mn	37,4	12,5	0,6	42,5	1,3
1 H	37,2	12,5	0,4	54,4	1,62
Cyclohexylbutyrate de sodium : 100 mg/kg I.D.					
1 H 30	36,9	12,5	1,1	97,6	3,52
2 H	36,6	11	2	106,8	2,72
2 H 30	36,4	10	1,8	101	1,94
3 H	36,3	10,5	1,7	87	1,83
3 H 30	36,1	10,5	1,7	90,7	2,14
4 H	36	11	1,4	80,9	1,68

Tableau 46

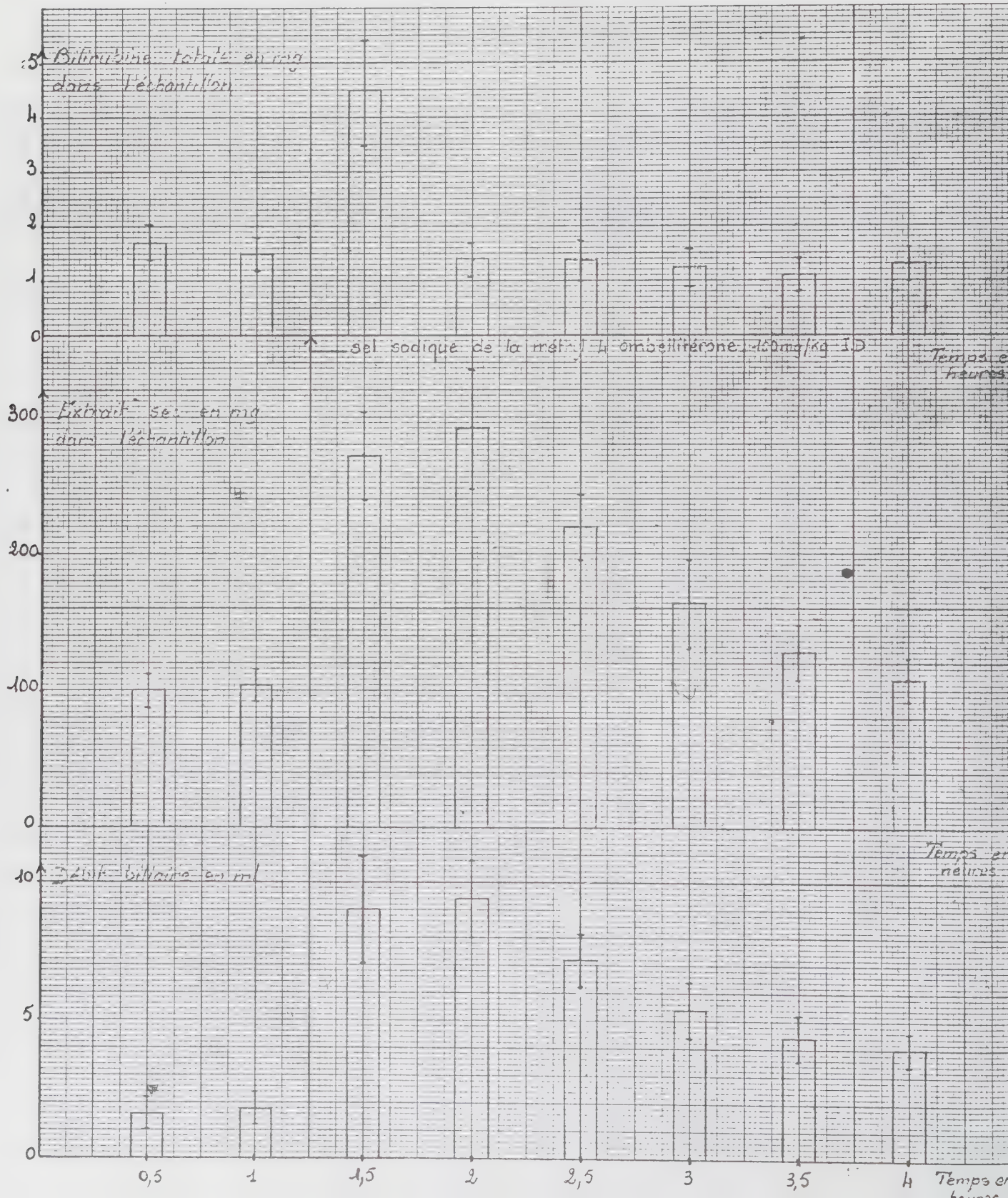
Chien femelle - 12 kg - n° 3

Déhydrocholate de sodium : 100 mg/kg I.D.

Temps	Température rectale en °C	Tension artérielle en cm de mercure	Débit biliaire en ml	Extrait sec en mg dans l'échantillon	Bilirubine totale en mg dans l'échantillon
30 mn	37	14	0,75	95,3	1,12
1 H	36,5	12	0,50	121,2	3,5
Déhydrocholate de sodium : 100 mg/kg I.D.					
1 H 30	36,3	9	10,25	312	8,53
2 H	36	9	10,5	283,5	6,77
2 H 30	35,7	10	7,3	167,3	2,85
3 H	35,3	11	4,75	141,7	2,05
3 H 30	35,5	11	3,35	130,4	2,25

Tableau 47

Evolution moyenne du débit biliaire, de l'excrétion de bilirubine et de l'extrait sec
chez 7 chiens recevant 100 mg/kg I.D de méthyl 4 ombelliférone
(les tirets verticaux représentent l'erreur sur la moyenne).



3°) Conclusion :

Nous retrouvons, sur cette espèce, l'activité cholérétique du corps n° 11. L'hypercholérèse est parfois très importante. Le volume biliaire excrété augmente de 3 à 10 fois, l'extrait sec de la bile de 2 à 4 fois, la bilirubine totale de 2 à 6 fois. Il existe donc un gain dans les quantités excrétées des constituants biliaires par rapport à la période de référence. Il faut noter la grande dispersion des valeurs de départ et celle de leur évolution au cours de l'essai, d'un chien à l'autre. En général, les variations imputables au produit sont visibles dans l'heure, au plus dans les 90 minutes qui suivent l'administration par voie duodénale. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec une dose identique de deux cholérétiques étalons : le déhydrocholate de sodium et le cyclohexylbutyrate de sodium. Pour ce produit, nous sommes en accord avec les remarques plus générales exposées par ROHRBACH et ROBINEAU (1958) - 449 - à l'occasion de l'étude d'autres cholérétiques : le corps n° 11 se classe parmi les cholérétiques vrais. Bien que la concentration biliaire de bilirubine aille en diminuant, la quantité excrétée augmente du fait de la très grande élévation de débit.

III - ETUDE DES EFFETS SPASMOLYTIQUES

DE LA METHYL 4 OMBELLIFERONE

Nous sommes amenés à nous intéresser à l'activité du corps n° 11 sur les fibres lisses, à la suite de diverses constatations :

- Effet hypotenseur du produit donné à doses suffisantes.
- Conclusions de GAZET du CHATELIER - 233 - (loc.cit.) parlant d'un effet ganglioplégique, que nous ne retrouverons pas : nous serons amenés à conclure à un effet papavérinique musculotrope prédominant, même dans le système vasculaire.
- Développements nombreux dans la connaissance des mécanismes de régulation de la zone d'abouchement du cholécyste au duodénum. Ces travaux récents incitent à des recherches nouvelles sur la pathologie et la thérapeutique des affections oddiennes. Dans une importante monographie, BIZARD et PARIS (1961) - 450 - ont récemment fait le point sur les activités pharmacologiques dans les voies biliaires. CREMA (1965) - 451 - s'est attaché plus particulièrement à la région oddienne. Des cliniciens [DEBRAY et coll. (1960) - 452 -] ont montré qu'un blocage morphinique du sphincter, accompagné d'une hyperpression cholédocienne, est susceptible de déclencher un syndrome migraineux. Certaines préparations cholérétiques paraissent capables d'amender ces symptômes [DEBRAY (1962) - 453 -].

Tout ceci nous engage à vérifier l'activité spasmolytique de la méthyl 4 ombelliférone dans le domaine viscéral digestif, vasculaire et cholédocien.

1 - METHODES D'ETUDE DES EFFETS SPASMOLYTI- QUES DU CORPS N° 11 -

/ A - Méthode d'étude des effets spasmolytiques dans le domaine /
/ viscéral /

1°) Sur organes isolés :

Nous mettons en œuvre la méthode de MAGNUS (1904)
- 454 -. Un fragement de duodénum d'un rat à jeun de
la veille est maintenu en survie dans un bain de liquide de
Tyrode aéré et chauffé à 38° C. Le système permet l'en-
registrement des mouvements péristaltiques.

Composition du liquide de survie utilisé :

Pour 6 litres :

- Glucose	6 g
- Bicarbonate de sodium	6 g
- Liquide de Tyrode concentré	300 ml
- Eau permutée q.s.p	6 litres.

Liquide concentré :

- Chlorure de sodium	160 g
- Chlorure de potassium	4 g
- Chlorure de calcium (cristallisé à 48 % d'eau)	4 g
- Chlorure de magnésium	2 g
- Eau permutée q.s.p	1.000 g

La cuve du bain de survie a une capacité de 20 ml. Le fragment a 1,5 cm de long. Il est accroché dans la partie inférieure de la cuve, à un ajutage en verre creux permettant par ailleurs l'aération du bain (2 à 3 bulles/seconde). La partie supérieure est solidaire d'un système d'enregistrement kymographique frontal, de type isotonique.

Les contractions musculotropes maximales sont obtenues par addition au bain d'une solution aqueuse de chlorure de baryum à 4 mg/ml (addition de 0,5 ml, soit 2 mg de Cl_2Ba). Le contracturant agit pendant 30 secondes. Lorsque la contraction est maximale, nous ajoutons l'agent spasmolytique étalon ou le corps n° 11, le temps de contact étant de 1 minute. Après cette séquence, deux lavages sont nécessaires, suivis d'un repos de 5 minutes avant tout nouvel essai. Le décontracturant de référence est la papavérine, dont nous utilisons le chlorhydrate. Nous recherchons la dose de papavérine donnant dans le temps imparti une décontraction de 50 %. Les doses actives sont, dans nos conditions de travail, d'environ 10 μg par ml de bain de survie. Nous recherchons la quantité de méthyl 4 ombelliférone sodée, dont l'addition au bain en présence de chlorure de baryum donne le même effet. L'activité du produit est exprimée en pourcentage de celle du spasmolytique de référence en fonction des quantités efficaces. Cet essai de type "curatif" peut être complété par un essai de type "préventif". La séquence devient : produit spasmolytique : contact de 30 secondes - produit contracturant : 1 minute - deux lavages - repos -.

L'activité "neurotrope" parasymphaticolytique est explorée de même. Dans ce cas, le contracturant est l'acétylcholine, dont nous ajoutons environ 5 μg dans la cuve. L'étalon spasmolytique de référence est l'atropine. L'activité recherchée est en général obtenue avec 0,25 μg d'alcaloïde.

2°) In situ :

Nous utilisons la méthode des ballonnets intestinaux sur le chien, décrite par GAUTRELET (1932) - 455 -. Nous étendons cet essai à une deuxième espèce : le lapin.

a) Sur le chien :

Nous utilisons le chloralose par voie veineuse, comme anesthésique (100 mg/kg). Sur quelques animaux, nous utilisons aussi le mébubarbital sodé (25 mg/kg I.V.) en constatant au passage l'effet inhibiteur de la motricité digestive de ce barbiturique. Nous enregistrons la tension artérielle systémique par manomètre de Ludwig en relation avec l'artère carotide. Nous pratiquons une laparotomie haute sur la ligne blanche ventrale. Nous isolons une anse duodénale. Nous pratiquons une fistule en tenant compte des précautions décrites par GAUTRELET pour éviter la destruction de l'innervation locale. Nous introduisons dans la lumière intestinale une canule reliée à un réservoir rempli d'eau tiède par un tube de caoutchouc, La canule est coiffée par un doigtier en caoutchouc, la ligature les rendant solidaires étant étanche. L'ajutage est introduit dans le sens du péristaltisme. Un système de capsule de MAREY, en relation avec la partie supérieure du réservoir rempli d'air, permet l'enregistrement des mouvements

spontanés de l'intestin. La pression dans le ballonnet est de l'ordre de 10 à 15 cm d'eau. Nous évitons le plus possible de sortir le duodénum de l'abdomen pendant le montage. La plaie est soigneusement recousue après remise en place du duodénum. L'abdomen de l'animal est maintenu au chaud par une couverture. L'injection I.V. de méthyl 4 ombelliférone sodée permet de vérifier l'effet de la drogue sur le tonus normal. Après contraction des fibres intestinales par divers médiateurs :

- Chlorure de baryum : 2 mg/kg en I.V. ou perfusion de 0,05 mg/kg/mn pendant au moins une heure.
- Chlorhydrate de morphine : 1 mg/kg en I.V.
- Dextromoramide : 0,5 mg/kg en I.V.

(Solvant dans tous les cas : soluté chloruré isotonique).

Il est possible d'observer les effets inhibiteurs du corps n° 11 et de les comparer à ceux de divers spasmolytiques.

Dans tous ces essais, nous vérifions l'absence de causes d'erreurs éventuellement dues à l'alcalinité des solutions de méthyl 4 ombelliférone sodée.

Nous donnons les divers produits spasmolytiques y compris le corps n° 11 à une dose correspondant à un même tantième de leur dose léthale 50 :

- Papavérine : 5,5 mg/kg I.V. type des spasmolytiques musculotropes,
- Aminopromazine : 12 mg/kg I.V. type de produit papavérinique musculotrope de synthèse, plus efficace que la papavérine, non atropinique.

Pour le corps n° 11, nous utilisons le 1/6e de la DL 50 souris par voie I.V. Des essais préliminaires nous donnent à ce sujet, les résultats suivants : la dose léthale 50 I.V. souris du corps n° 11 est proche de 250 mg/kg, ce qui conduit à injecter 41 mg/kg.

b) Sur le lapin :

La même méthode est développée, en utilisant un matériel de plus petit calibre, adapté au diamètre intestinal de l'animal. L'anesthésique généralement employé est l'uréthane que nous donnons à raison de 2 g par kg de poids par voie intrapéritonéale. Autre divergence : le contracturant musculotrope employé, le chlorure de baryum, est perfusé en I.V. en solution aqueuse. Seule la perfusion lente à 0,12 mg par kg et par minute permet l'obtention certaine de contractions d'amplitude suffisante. Le volume injecté à cette occasion est de 0,24 ml/min. L'agent spasmolytique est essayé 30 minutes après le début de la perfusion du contracturant et toujours à une dose correspondant au 1/6e de la dose léthale 50 souris I.V.

Ce genre d'essai permet de vérifier :

- L'action des spasmolytiques sur le tonus naturel des fibres viscérales et la durée d'action du produit dans ces conditions,
- L'action des spasmolytiques sur les contractions déclenchées par les agents spasmogènes,
- La réapparition des ondes de péristaltisme dans leur morphologie initiale,
- La durée d'action des effets spasmolytiques.

B - Méthodes d'étude des effets spasmolytiques dans le domaine vasculaire

1°) La vasomotricité coronarienne :

Elle est étudiée selon la technique de perfusion du cœur isolé de mammifères, selon LANGENDORFF - 188 - (loc.cit.).

Nous prélevons le cœur d'un cobaye de 300 à 500 g assommé et saigné. La perfusion des coronaires à partir de l'ostium aortique est conduite avec une solution de Locke-Ringer dont voici la formule :

- Chlorure de sodium	6,5 g
- Chlorure de potassium	0,14 g
- Chlorure de calcium cristallisé	0,12 g
- Carbonate acide de sodium	0,2 g
- Eau bidistillée q.s.p	100 ml

Le liquide est oxygéné à saturation, chauffé à 37° C et arrive dans les coronaires sous une pression constante ne dépassant pas 30 cm d'eau. Le débit coronaire effluent est enregistré par un système de compte-goutte à cellule photoélectrique couplée avec un intégrateur de Fleish. Un système de plusieurs vases de Mariotte reliés au perfuseur par un robinet à voies multiples permet de mesurer successivement :

- le débit normal (Locke-Ringer normal)
- le débit accéléré par la drogue étalon (Locke-Ringer additionné de papavérine à la concentration de 1×10^{-5})
- le débit éventuellement modifié par le sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone, à la même concentration.

Dans les deux derniers cas, la perfusion dure 100 secondes, après quoi on reperfuse du liquide normal. Les essais sont pratiqués sur plusieurs montages pour chaque espèce, l'ordre de passage variant chaque fois, par exemple :

- 1er cœur : papavérine - corps n° 11 - papavérine
- 2e cœur : corps n° 11 - papavérine - corps n° 11.

S'il y a une vasodilatation, on constate une augmentation du débit à pression constante. Sur l'enregistrement kymographique, le nombre de gouttes est d'abord à peu près constant en un temps donné (temps de chute du stylet de l'intégrateur de Fleish). Puis, sous l'influence du médicament, il s'élève pour revenir au bout d'un temps variable après l'arrêt de la perfusion du produit, au niveau de départ.

Dans ces conditions, nous mesurons, par planimétrie, la surface correspondant à l'augmentation de débit. Nous comparons les surfaces représentant l'augmentation de débit due à l'action de l'étalon et celle résultant de l'effet de la même dose (même concentration, même temps de passage) du corps n° 11. Nous exprimons les résultats moyens obtenus sur plusieurs montages. Nous posons : moyenne d'augmentation du débit due à la papavérine = 100.

2°) A la périphérie :

L'étude de l'évolution des résistances vasculaires sous l'influence de la méthyl 4 ombelliférone est conduite :

a) Par la mesure des effets tensionnels systémiques sur diverses espèces endormies :

- sur le rat endormi au mébubarbital (50 mg/kg I.P.) et dont la tension artérielle systémique est enregistrée à la carotide par un micromanomètre de Condom,
 - sur le chat endormi à l'éther puis au mébubarbital par voie I.P. (25 mg/kg I.P.), la tension étant enregistrée dans les mêmes conditions,
 - sur le chien endormi par injection de chloralose (100 mg/kg I.V.) ou de mébubarbital (25 mg/kg I.V.).
- Dans ce cadre, nous disposons de réponses tensionnelles enregistrées lors des essais de cholérèse, de spasmolyse, avec des ballonnets multiples ou de mesures rotamétriques des débits sanguins périphériques.

b) Par les méthodes de BINET BURSTEIN et de SHIPPLEY WILSON mesurant le débit artériel périphérique :

- BINET et BURSTEIN (1949) - 456 - ont montré que, sur le chien endormi, un shunt externe artère carotide - artère fémorale permettait d'alimenter à débit constant la patte arrière correspondant au territoire fémoral choisi, à condition d'intercaler dans le circuit estracorporel une pompe à galet de type Jouvelet. Sur une telle préparation, la pression à l'aval de la pompe reste constante pour autant que les résistances périphériques sont stables dans la patte subissant la perfusion. Toute injection d'un corps vasodilatateur abaisse la pression et toute injection d'un vasoconstricteur l'élève.

- SHIPPLEY et WILSON (1955) - 457 - ont décrit un appareillage rotamétrique permettant de mesurer exactement et de façon continue les variations de débit dans l'artère d'un membre irrigué par le propre sang de l'animal à sa pression systémique. Nous choisissons des chiens de 15 kg au moins anesthésiés au mébubarbital (25 mg/kg en I.V. suivis d'une perfusion de 7 mg/kg/heure). La tension artérielle est mesurée par canulation d'une artère et enregistrement par le manomètre de Ludwig. Dans l'étude de la vasomotricité de la patte postérieure, le circuit extracorporel comprenant le rotamètre part de la carotide pour aller à l'artère fémorale de la patte considérée. Un shunt artère carotide-rotamètre - veine jugulaire externe, permet de vérifier le réglage du rotamètre et d'éviter l'apparition de caillots en procédant à des purges périodiques. Les animaux sont héparinés à 800 U.I./kg au départ, dose initiale relayée par des doses horaires de 100 U.I./kg. Les produits sont essayés à des doses équitoxiques (même dixième de la DL 50 I.V. souris). En général, la papavérine est prise comme étalon. Nous utilisons aussi les produits commercialisés pour les mêmes propriétés. Les produits sont injectés par voie I.V. dans la veine saphène de la patte arrière ou par voie I.A. Nous avons résumé notre méthode originale de mesure des variations de débit sanguin artériel, tant périphérique que coronaire, dans un travail publié dans "Thérapie" (1963) - 458 -. En bref, l'amplification de sortie du rotamètre donne des indications visuelles sur un galvanomètre. Nous avons

adapté aux bornes de ce galvanomètre un enregistreur électronique à remise au zéro automatique, par compensation du courant fourni par le galvanomètre. Le moteur de remise à zéro est suffisamment puissant pour faire mouvoir un stylet tangentiel enregistrant les variations de débit sur le papier noirci qui reçoit aussi l'enregistrement des variations tensionnelles. Après vasodilatation, il est possible de mesurer la surface de la courbe d'augmentation de débit par planimétrie, et d'exprimer le résultat en fonction de celui obtenu avec une dose équitoxique de la substance étalon.

c) Interférences cardiaques :

Les effets tensionnels d'un produit ne peuvent être rattachés à son action vasculaire, qu'à condition de vérifier l'absence d'interférence cardiaque.

Nous nous sommes limités à la mesure d'effets inotropes éventuels par la méthode du mécanogramme cardiaque, telle qu'elle est décrite par GAUTRELET - 455 - (loc.cit.). Sur un chien endormi au mébubarbital (doses habituelles), et dont la respiration est entretenue par un groupe respiratoire en relation avec l'animal grâce à une sonde trachéale à ballonnet, nous enregistrons la tension artérielle systémique à l'artère carotide. Après ouverture du thorax et formation d'un lit péricardique en quatre points par fixation à la paroi musculaire, nous saisissons avec deux serre-fines l'auricule droit et la paroi du ventricule gauche. Chaque serre-fine est en relation avec un système d'enregistrement comportant un tambour de Marey enregistreur. Les corps essayés sont injectés par voie intraveineuse.

Dans tous ces essais où le dérivé sodique de la méthyl 4 ombelliférone est employé, notre premier soin est toujours de vérifier l'absence de réponse physiologique à l'injection d'un volume de solution alcaline amenée à pH 9, égal à celui qui sera utilisé dans l'essai proprement dit.

/ C - Méthodes d'étude des effets spasmolytiques au niveau du /
/ cholécyste /

Nous nous intéressons ici à l'action éventuelle du produit dans les diverses régions du tractus biliaire.

1°) Recherche des effets sur la vésicule biliaire :

La méthyl 4 ombelliférone est un cholérétique étudié sur le rat - espèce sans vésicule biliaire - et sur le chien à canal cystique lié. Ces travaux ne nous donnent pas d'information sur l'action vésiculaire du produit. Il paraît intéressant de connaître ces effets relachants éventuels ou cholécystokinétiques.

a) Méthode de la vésicule isolée du cobaye :

Selon CHIRAY et DEBRAY (1943) - 459 -, méthode modifiée par PARIS et VANLERENBERGHE (1956) - 460 -.

Sur un animal anesthésié à l'uréthane (1 g/kg par voie I.P.) nous prélevons la vésicule pleine de bile, le cystique ayant été ligaturé avant l'exérèse. L'organe est plongé dans une allonge en verre remplie de Tyrode oxygéné et thermostaté à 37° C. Un montage du type de celui mis en œuvre dans

la technique de MAGNUS permet l'enregistrement des contractions de l'organe. Comme les auteurs l'ont précisé, il faut un long temps de repos pour observer les premières ondes péristaltiques. L'effet décontracturant peut être mis en lumière, soit directement, soit par action curative contre un spasme obtenu avec addition préalable de chlorhydrate d'acétylcholine dans le bain (0,1 μ g par ml de bain de survie). L'effet cholécystokinétique direct du corps n° 11 peut être recherché en ajoutant au bain de survie 5 ml d'une solution du dérivé sodé.

b) Méthode utilisant la vésicule du chien in situ :

Cet essai est conduit sur le chien endormi avec 25 mg/kg de mébubarbital par voie veineuse. Une laparotomie abdominale haute permet d'exposer le canal cystique qui est lié. Le fond de la vésicule est canulé. La vésicule est remplie par ce moyen de sérum physiologique tiède. La canule est en relation avec une capsule de Marey enregistreuse permettant d'inscrire un tracé kymographique des variations de pression intravésiculaire. La pression dans l'organe est réglée de façon à obtenir un tracé montrant les ondulations spontanées. Un maximum de 30 cm d'eau ne doit pas être dépassé. L'injection I.V. de sel sodique du corps n° 11 permet de juger de l'effet propre du cholérétique. Divers traitements : injection de carbacholine, de pilocarpine (agents contracturants), administration d'un "repas gras" (sécrétion de cholécystokinine), déclenchent une contraction de la vésicule. Nous recherchons les effets du corps n° 11 sur de tels phénomènes cholécystokinétiques.

2°) Recherche des effets de la méthyl 4 ombelliférone sur la région oddienne :

En 1959, BOISSIER et CHIVOT - 461 - décrivent une méthode de mesure du débit de perfusion du cholécyste à partir du fond vésiculaire chez le cobaye. La liquide physiologique perfuse les voies biliaires à pression constante et s'écoule par le sphincter d'Oddi. Les variations de tonicité de ce dernier influent sur le débit. Ce fructueux montage permet aux auteurs l'étude de divers paramètres physiologiques. Rapidement, MACABIES et coll. - 462 -, STALPORT (1964) - 463 - et CANELLAS (1965) -464- en utilisent le principe à des fins thérapeutiques ou pharmacodynamiques. Les auteurs italiens s'orientent plutôt vers des méthodes "in vitro" et récupèrent sur l'animal (veau en particulier) l'appareil sphinctérien qu'ils perfusent selon les techniques classiques d'organes isolés [CREMA et BENZI (1960) - 465 -, (1963) - 466 -]. BALDONI et DE BERNARDI appliquent les deux méthodes "in vitro" et "in situ" à l'étude de nouveaux spasmolytiques (1963) - 467-. Finalement, une étude comparée de l'effet de divers contracturants et spasmolytiques conduit récemment BENZI et CREMA à préférer la méthode "in situ" (1966) - 468 -.

Nous avons largement utilisé la technique "in situ" de BOISSIER et CHIVOT sur le cobaye et nous l'avons aussi adaptée au chien.

a) Sur le cobaye :

Nous utilisons des cobayes de sexe mâle, pesant au moins 300 grammes. Les animaux sont à jeun depuis six heures au moins et douze heures au plus (au delà, nous avons remarqué que le débit biliaire est anormalement élevé). L'anesthésique employé est l'uréthane, à 1,5 g/kg par voie I.P. Nous pratiquons la respiration artificielle, après canulation trachéale, ce qui favorise la régularité du débit oddien. Une laparotomie ventrale haute donne accès au carrefour cholédocien. Le tube digestif est lié au niveau du pylore. La vésicule biliaire est ponctionnée. Nous fixons alors dans le fond vésiculaire une canule courte, renflée, assurant l'étanchéité du système de perfusion. Grâce à une fistule duodénale, pratiquée à 3 cm à l'aval du pylore, nous fixons un tube plastique qui servira à l'écoulement à l'extérieur du liquide de perfusion venant du cholédoque et du sphincter oddien à partir du canal cystique et du fond vésiculaire. Ce tube de 4 mm de diamètre et de 10 cm de long est assuré sur la paroi intestinale par fil de lin. Son extrémité libre doit rester dans le même plan horizontal que l'abdomen. A 1 cm, à l'aval de cette première canulation, nous faisons une autre incision et nous plaçons un autre cathéter intestinal dans le sens du transit digestif, qui servira à injecter les drogues par voie duodénale. Il faut utiliser un tube fin et long, ce qui évite les manipulations près du duodénum qui entraîneraient des artéfacts dans le débit biliaire. Les injections veineuses sont pratiquées directement dans la veine jugulaire préparée.

Dans tous les cas, un flacon de Mariotte rempli de sérum physiologique (ClNa 90/00) est relié à la canule serrée sur le fond de la vésicule. Le bout du tube plongeant au sein du liquide est de 12 à 16 cm au-dessus du plan de l'abdomen de l'animal. L'équipement permet un réglage des niveaux respectifs. Selon BOISSIER et CHIVOT, cette pression, inférieure à la pression physiologique de la sécrétion biliaire, n'empêche pas la fonction excrétrice normale du foie. L'essai commence toujours au niveau minimum de pression. Le sérum physiologique s'écoule goutte à goutte dans un petit réservoir plastique de perfusion veineuse utilisé en clinique, puis dans la vésicule biliaire. Un système électronique (source lumineuse et cellule photoélectrique au niveau du petit réservoir plastique - contacteur - compteur intégrateur du type Fleish) permet l'enregistrement du débit sur papier kymographique. Le débit normal est d'environ 1 ml/min.

L'écoulement oddien normal est vérifié sur une période de 15 minutes. Nous injectons alors le contracturant choisi :

- morphine 1 à 5 mg/kg par voie I.V.
- carbacholine 5 à 10 µg/kg par voie I.V.
 ou 75 mg/kg par voie I.D.

sous un volume de 0,1 ml/100 g par voie I.V. et 0,5ml/100 g par voie I.D. Le solvant habituel est le sérum physiologique dont nous vérifions qu'il est inactif sur la tonicité oddienne même porté à pH 9 par addition de soude diluée.

Parfois, il n'existe aucun débit ou un débit très faible spontané sur certaines préparations, malgré toutes les manipulations possibles des cathéters. Ce genre de préparation présentant une hypertonicité naturelle du sphincter d'Oddi se révélera précieuse dans nos essais.

La carbacholine déclenche irrégulièrement un spasme oddien de très longue durée. La morphine déclenche à 1 mg/kg I.V. un spasme donnant un arrêt total du débit pendant au moins 40 minutes, mais se prolongeant parfois plus de deux heures. Le blocage morphinique ne semble se produire qu'une seule fois sur une préparation donnée.

L'effet spasmolytique peut être coté de la façon suivante à partir d'un débit nul :

- ± réapparition de 2 ou 3 gouttes de liquide de perfusion après l'injection du décontracturant.
- ± débit à peine amorcé.
- + débit inférieur au débit initial avant blocage morphinique. Le phénomène ne dure pas.
- +± débit égal au débit initial et ne dure pas.
- ++ débit supérieur au débit initial et ne dure pas
ou
débit inférieur au débit initial mais définitif.
- +++ débit définitivement supérieur au débit initial (avant blocage morphinique).
- ++++ débit très supérieur au débit initial.

b) Sur le chien :

L'intérêt de ce montage est de pouvoir comparer, sur la même espèce, les effets cholérétiques, spasmolytiques vésiculaires ou cholagogues, spasmolytiques viscéraux et oddiens de la méthyl 4 ombelliférone et, de plus, d'essayer de confirmer sur une deuxième espèce les résultats obtenus sur le cobaye.

La technique est absolument identique à celle décrite avec le cobaye. L'animal est endormi par injection I.V. de chloralose - uréthane : 2 ml/kg d'un mélange comportant 16,5 g d'uréthane et 1,65 g de chloralose, qui donne une anesthésie plus profonde et plus régulière, sans obligation de rappels fréquents. La pression minimal de franchissement du sphincter d'Oddi est aussi de 12 à 15 cm d'eau. Il semble nécessaire de laisser le débit s'équilibrer pendant plus longtemps que chez le cobaye. 1 mg de morphine injecté par kg de poids corporel a un effet contracturant retrouvé aussi avec 25 µg/kg de carbacholine. Toutes ces injections sont intraveineuses.

2 - RESULTATS DES ETUDES SUR L'EFFET SPASMO- LYTIQUE DU CORPS N° 11 -

/ A - Effets spasmolytiques dans le domaine viscéral /

1°) Sur le duodénum isolé du rat :

Après contraction par le chlorure de baryum, l'activité spasmolytique musculotrope de la méthyl 4 ombelliférone semble 10 fois inférieure à celle du chlorhydrate de papavérine.

Ce résultat est retrouvé sur plusieurs essais, la dose active du corps étant de l'ordre de 1,5 mg dans l'allonge de 20 ml. Cet effet est aussi bien retrouvé quand le corps est ajouté après ou avant le poison contracturant.

Dans le domaine neurotrope, le corps n° 11 a une activité spasmolytique nulle, de l'ordre du 1/10.000^e de celle du sulfate d'atropine.

Au total, le produit est peu actif in vitro.

2°) Essai in situ :

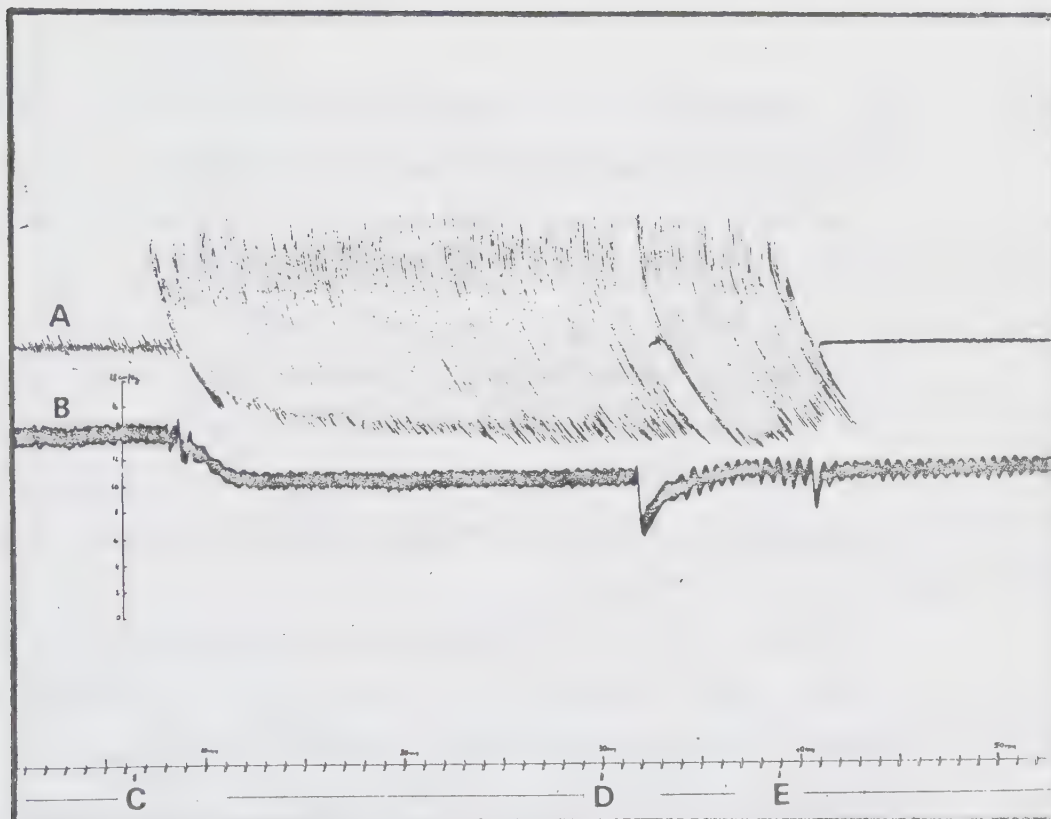
a) Sur le chien :

Le corps n° 11, à la dose de 41 mg/kg I.V., a les effets suivants :

- Sur les contractions déclenchées par le chlorure de baryum, nous notons une inhibition de l'hypermotricité caractéristique du poison employé, pour un chien sur les cinq utilisés. Les quatre autres montages n'ont pas permis de mettre en évidence un effet musculotrope important in situ, sauf dans un cas où l'effet fut très puissant mais de très courte durée (2 à 4 minutes).
- Sur les contractions déclenchées par les morphiniques (morphine et dextromoramide), l'effet spasmolytique le plus prolongé fut de 30 minutes (3 cas), mais dans les cinq autres montages on note une activité puissante mais de très courte durée. Le tracé ci-joint (n° 1) illustre ces conclusions.

Tracé n° 1

Chien endormi au mébubarbital



A : motricité duodénale

B : tension artérielle

C : Dextromoramide..... 0,5 mg/kg I.V.

D : Méthyl 4 ombelliférone 41 mg/kg I.V.

E : Atropine..... 2 mg/kg I.V.

Dans les mêmes conditions, 12 mg/kg d'aminopromazine ont une activité spasmolytique duodénale très prononcée, aussi bien contre le chlorure de baryum (trois montages) que sur la morphine (deux montages). Le blocage des contractions dure souvent plus d'une heure. L'hypertonie, quand elle existe, est fortement réduite.

La papavérine elle-même (trois préparations) montre, à 5,5 mg/kg (toujours 1/6^e de la DL 50 I.V. souris) un effet spasmolytique curatif bloquant l'hypertonie et l'hypermotricité pendant au moins 30 minutes.

L'atropine, essayée en complément à la très faible dose de 2 mg/kg I.V., a sur les divers agents spasmogènes, un effet curatif, intense et prolongé : sur les cinq montages exécutés, la durée de l'effet dépasse toujours une heure.

Au total, sur les 18 chiens utilisés au cours de cette étude, nous voyons que le corps n° 11 confirme sa faible activité spasmolytique viscérale telle qu'elle a été précisée dans les essais "in vitro". Les spasmolytiques majeurs sont beaucoup plus puissants, en particulier par leur durée d'action, même contre les agents spasmogènes morphiniques.

b) Sur le lapin :

Les essais sont conduits sur des lots de trois animaux :

- un premier lot sert à tester l'effet curatif de 5,5 mg/kg I.V. de papavérine : l'activité spasmolytique est nettement retrouvée à cette dose, la durée de l'effet étant assez courte, de l'ordre de quelques minutes.
- sur un deuxième lot, nous vérifions que 1 mg/kg de sulfate d'atropine inhibe totalement les spasmes induits.
- sur un troisième lot, 12 mg/kg d'aminopromazine ont un effet d'une durée intermédiaire entre celle de l'atropine et de la papavérine (au moins 30 minutes).
- sur un dernier lot, 41 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone sodée injectés par voie I.V. montrent un effet très inférieur à celui de l'aminopromazine et presque égal à celui de la papavérine.

Par conséquent, sur les douze lapins utilisés, nous voyons que le corps n° 11 a une activité spasmolytique papavérinique de l'ordre de celle d'un produit de référence ; les résultats sont un peu meilleurs sur le lapin que sur le chien.

Au total, le corps n° 11 n'est qu'un faible spasmolytique viscéral, de type papavérinique dont l'activité n'est, la plupart du temps, qu'une fraction de celle de la papavérine, sauf chez le lapin où le produit étudié approche l'étalon, lui-même d'activité très faible.

/ B - Effets spasmolytiques dans le domaine vasculaire /

1°) Dans le domaine coronaire :

Sur plusieurs cœurs isolés de cobayes, l'augmentation de débit de perfusion des artères coronaires est de l'ordre du dixième de celui observé avec la même concentration de papavérine dans le milieu de survie (1×10^{-5}).

2°) Dans la circulation générale :

a) Effets tensionnels systémiques :

Ils sont étudiés chez le rat, le chat et le chien.

- Sur le rat (11 montages), des doses de 25 à 50 mg/kg en I.V. déclenchent des hypotensions reproductibles atteignant 5 cm de mercure durant quelques minutes.
- Sur le chat (3 montages), des doses de 5 à 20 mg/kg en I.V. amènent aussi une hypotension fugace. L'accumulation des doses semble empêcher la récupération du niveau tensionnel de départ.
- Sur le chien, de très nombreuses préparations physiologiques : étude de la motricité intestinale, de la vasomotricité périphérique, de la cholérèse, de la motricité oddienne, etc... s'accompagnent de l'enregistrement du niveau tensionnel. Dans ces circonstances diverses, des doses de 5 à 50 mg/kg du sel sodique sont injectées par voie veineuse, ainsi que des doses de 100 mg/kg du dérivé non sodé par voie duodénale (cholérèse). Dans

tous les cas, et comme il est visible sur le précédent tracé (n° 1 - page 305), il existe une réponse hypotensive, croissant avec la dose, rapide à s'installer et de courte durée.

Au total il existe, dans ces diverses espèces, par diverses voies et à des doses allant de 10 à 100 mg/kg, une réponse hypotensive modérée, et surtout fugace. Cette hypotension est le signe d'un effondrement des résistances périphériques, ou d'une diminution de l'efficacité cardiaque, ce qui nous conduit à donner les deux groupes suivants de résultats.

b) Effets sur les débits sanguins périphériques :

Selon la méthode de BINET et BURSTEIN (3 essais), l'injection de 20 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone sodée, en intra artérielle, à l'aval de la pompe de Jouvelet, déclenche une chute bien marquée de la pression de perfusion de la patte dont le débit est maintenu constant : baisse de 1/5^e de la pression initiale, avec normalisation en 10 minutes. Il existe un effet vasodilatateur périphérique.

Selon la méthode rotamétrique de SHIPPLEY-WILSON (3 chiens), 1 mg/kg de dérivé sodique de la méthyl 4 ombelliférone, injecté par voie artérielle, déclenche une vasodilatation certaine, le débit passant dans un des montages, de 35 à 95 ml/minute dans l'artère fémorale. Cet effet est égal à celui observé après injection de 0,125 mg/kg I.A. de chlorhydrate de papavérine.

L'action dilatatrice périphérique est certaine, mais de courte durée.

c) Interférences cardiaques :

Le mécanogramme cardiaque à thorax ouvert permet de préciser la réponse du chien endormi à l'injection I.V. de sel sodé de la méthyl 4 ombelliférone : l'effet inotrope auriculaire et surtout ventriculaire est positif et assez durable (plus de 15 minutes). L'effet chronotrope est aussi positif mais beaucoup plus discret (sur trois montages en tout).

En résumé, dans le domaine vasculaire, le corps présente une activité dilatatrice due à l'effet papavérinique musculo-trope sur les fibres lisses des artères et artérioles périphériques. La tension artérielle a plutôt tendance à l'abaissement, phénomène aussitôt compensé par une correction cardiaque chronotrope et surtout inotrope positive ; on peut affirmer la prédominance de l'effet papavérinique, puisque sur le chien endormi, les phénomènes périphériques et tensionnels se maintiennent même après blocage des systèmes sympathiques et parasympathiques (par injection I.V. de 0,5 mg d'Yohimbine, dose adrénalinoverseuse, et de 1 mg/kg de sulfate d'atropine, dose inhibant largement l'hypotension acétylcholinique).

/ C - Etude des effets spasmolytiques au niveau du cholécyste /

1°) Sur la vésicule biliaire - Le produit est-il cholagogue ?

Selon la technique de CHIRAY et DEBRAY utilisant la vésicule isolée du cobaye, des doses de sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone atteignant 1 mg par ml de bain de survie n'ont pas permis de modifier les mouvements propres de l'organe isolé, ni de s'opposer aux effets contracturants de l'acétylcholine (4 montages).

Huit préparations permettent de contrôler les effets de la méthyl 4 ombelliférone sur la vésicule in situ chez le chien endormi. Des doses de 30 à 60 mg/kg I.V. de sel sodique du corps n° 11 provoquent habituellement un relachement vésiculaire très net durant de 10 à 30 minutes. Des doses intraveineuses de 10 à 100 µg/kg de carbacholine, de 10 µg/kg d'acétylcholine, l'excitation électrique du bout périphérique du vague augmentent le tonus vésiculaire et l'amplitude des mouvements propres. Sur de telles préparations, le corps testé n'a pas d'effet spasmolytique. Cependant, sur un chien, 60 mg/kg I.V. du produit ont ramené au tonus normal et pendant 15 minutes une préparation vésiculaire préalablement contractée par la carbacholine. Dans deux cas, un repas gras administré par voie intraduodénale (2 ml/kg d'huile d'olive plus deux jaunes d'œufs) a conduit à une hypertonicité lente de la vésicule, durant 1 à 2 heures, phase au cours de laquelle 60 mg/kg I.V. de méthyl 4 ombelliférone ont ramené le tonus normal pendant 15 minutes.

En résumé, le corps n° 11 n'est pas un cholagogue, au contraire, il déclenche in situ un relachement vésiculaire très net. Dans certains cas, il est capable de s'opposer aux effets contracturants des parasymphicomimétiques ou des agents déclenchant la sécrétion de cholécystokinine (repas gras).

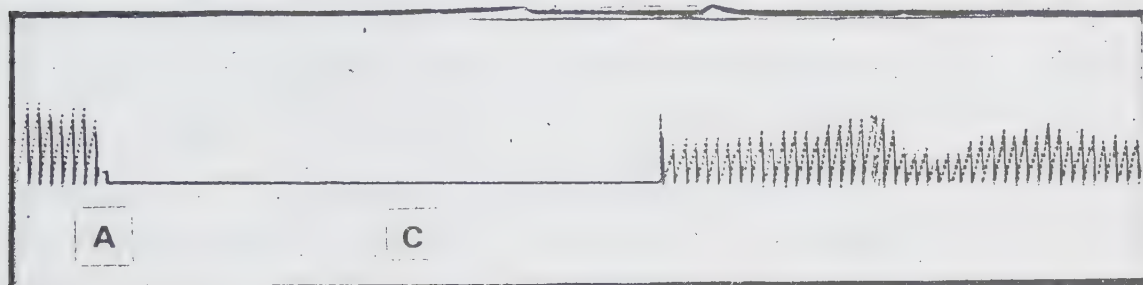
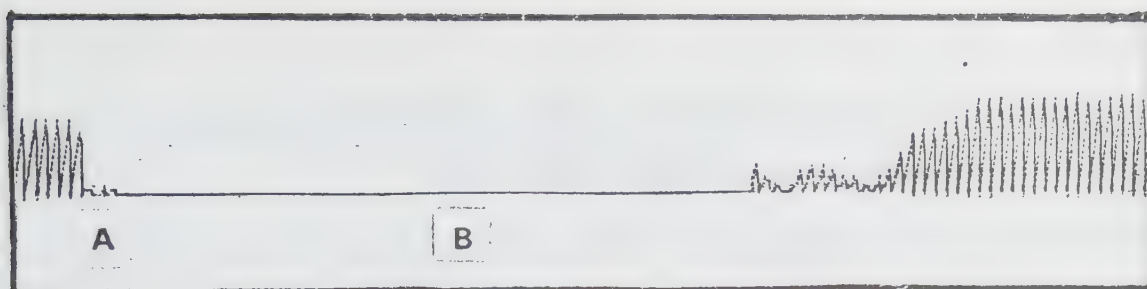
2°) Activité spasmolytique oddienne :

a) Sur le cobaye :

Plus de 50 montages sont utilisés dans cette partie de notre travail. Nos expériences se sont déroulées en plusieurs temps.

1 - Effet de la méthyl 4 ombelliférone injectée en I.V. sur le sphincter d'Oddi contracté par la morphine.

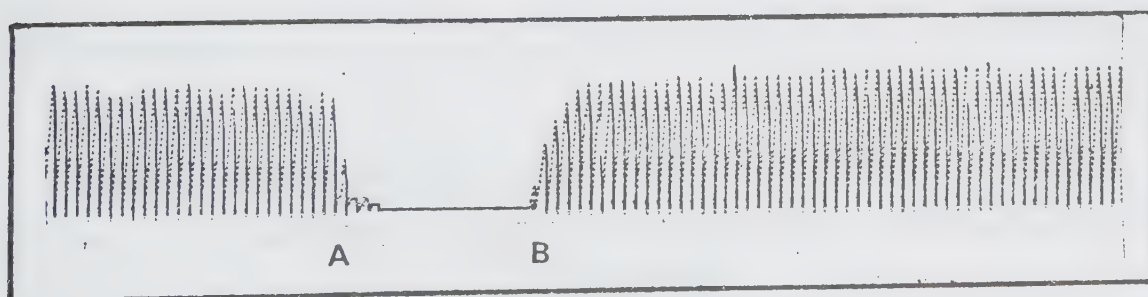
Des doses de 5, 10 et 20 mg/kg libèrent le cholécyste préalablement contracté. Le débit de perfusion du cholécyste reprend immédiatement et souvent plus fortement qu'au départ. Le résultat est inconstant avec 5 mg/kg. La dose minima spasmolytique de façon certaine est de 10 mg/kg I.V. Le tracé n° 2 montre le blocage morphinique et sa durée. Le tracé n° 3 illustre les effets du corps n° 11 : rapidité d'action, faible dose active, puissance du débit restauré et aspect définitif de cette restauration.



Tracé n° 2

Effet constricteur de la morphine sur le cholécyste du cobaye

- A 1 mg/kg de morphine
- B durée totale du blocage : 51 minutes
- C durée totale du blocage : 48 minutes.



Tracé n° 3

Effet de la méthyl 4 ombelliférone sur le débit de perfusion
du cholécyste du cobaye après morphine

- A morphine : 1 mg/kg I.V.
- B méthyl 4 ombelliférone : 5 mg/kg I.V.

2 - Activité entérale de la méthyl 4 ombelliférone sur le sphincter d'Oddi contracté.

L'absorption entérale du corps n° 11, forme acide, est facilitée par la présence de traces de bile in situ. Nous vérifions que l'administration par fistule duodénale de 1,5 ml de la propre bile du cobaye en expérience (obtenue par ponction vésiculaire au moment du montage) ne lève pas le spasme déclenché par injection I.V. de 1 mg/kg de morphine. Par contre, après administration de bile par voie I.D., 50 mg/kg de corps n° 11 par la même voie ont un effet spasmolytique puissant et prolongé. Le produit est actif même par voie digestive. Le tracé ci-joint (n° 4) montre que la réponse est très progressive, ce qui est dû au temps d'absorption intestinale.



Tracé n° 4

Débit de perfusion du cholécyste - cobaye

- A morphine : 1 mg/kg I.V.
- B bile propre de l'animal : 1,5 ml I.D.
- C méthyl 4 ombelliférone : 50 mg/kg I.D. - effet puissant et prolongé - débit supérieur au débit de base.

3 - Effets de la méthyl 4 ombelliférone sur les cholécystes normalement hypertoniques :

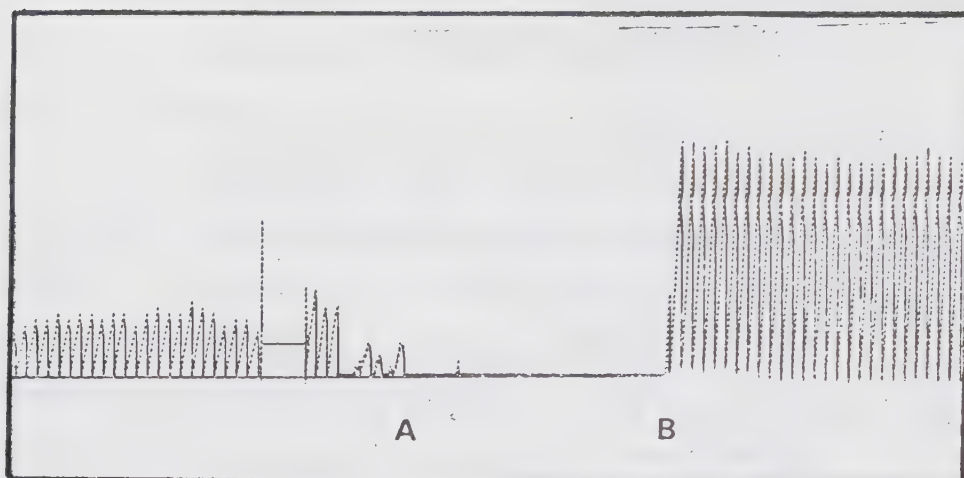
Sur un certain nombre de préparations, le cholécyste n'est pas perméable (10 % environ). Malgré l'élévation de la pression de perfusion (jusqu'à 18 cm d'eau) et malgré des vérifications soigneuses de la disposition des divers cathéters, le sérum physiologique ne s'écoule pas, ou très peu. Dans ces conditions, l'administration intraveineuse du corps n° 11 a toujours permis la reprise de l'écoulement. Ceci est important car on ne peut parler ici d'un phénomène "antimorphine" du corps n° 11, puisque ce contracturant n'est pas en cause.

10 à 40 mg/kg I.V. sont nécessaires pour obtenir un écoulement à caractère définitif. Sur une préparation, de faible débit initial, l'administration de 10 puis 20, puis 30 mg/kg I.V. déclenche chaque fois un nouveau palier de débit plus élevé, comme si le cholécyste répondait de façon graduelle et proportionnelle à la dose injectée.

Dans un cas de débit nul, 10 mg/kg du dérivé sodé par voie duodénale font démarrer l'écoulement. Il y a normalement un temps de latence de 1 minute 30 secondes.

Ultérieurement, sur le débit régulier et soutenu ainsi instauré, 3 mg/kg de morphine sont incapables de bloquer le sphincter d'Oddi.

L'effet du corps n° 11 est donc à la fois curatif et préventif dans le cadre de l'essai.

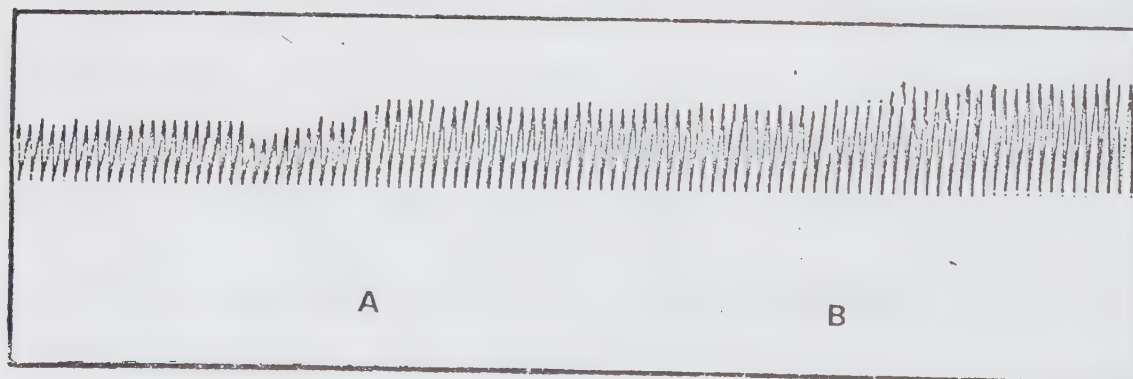


Tracé n° 5

Débit de perfusion du cholécyste - cobaye

A : arrêt naturel de l'écoulement

B : méthyl 4 ombelliférone : 20 mg/kg I.V.



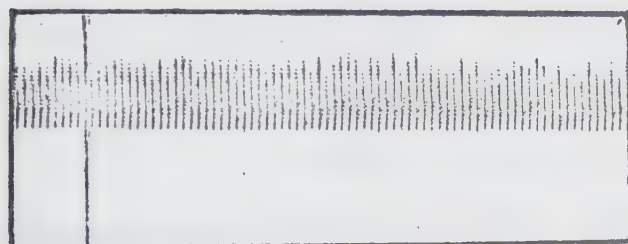
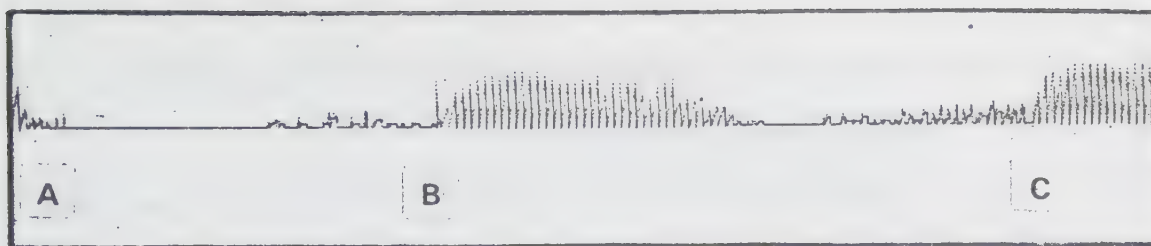
Tracé n° 6

Débit de perfusion du cholécyste du cobaye

Injectons I.V. successives de méthyl 4 ombelliférone

A : 10 mg/kg I.V.

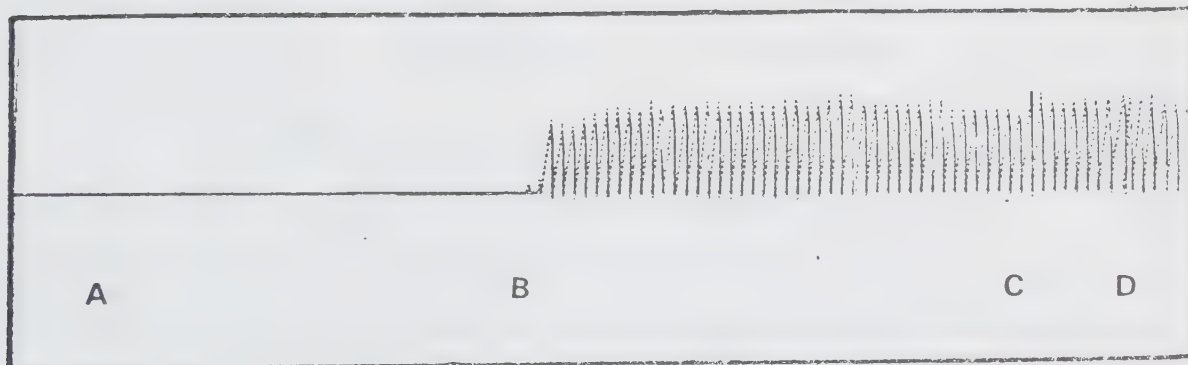
B : 20 mg/kg I.V.



- A : débit spontané presque nul
 B : manipulation des cathéters
 (vérification de l'absence de
 coudure : écoulement transi-
 toire)
 C : méthyl 4 ombelliférone :
 10 mg/kg I.V.

Tracé n° 7

Débit de perfusion du cholécyste du cobaye



Tracé n° 8

Débit de perfusion du cholécyste - cobaye

- A : écoulement spontané totalement nul
 B : méthyl 4 ombelliférone : 10 mg/kg I.V.
 C : morphine : 1 mg/kg I.V.
 D : morphine : 2 mg/kg I.V.

Ces deux dernières injections n'interrompent pas le débit.

4 - Etude de l'effet des spasmolytiques majeurs ou des cholérétiques reconnus :

Nous cherchons à comparer l'efficacité importante du corps n° 11 à celle de spasmolytiques majeurs, les résultats précédents étant assez inattendus, compte tenu du pouvoir papavérinique faible de la méthyl 4 ombelliférone.

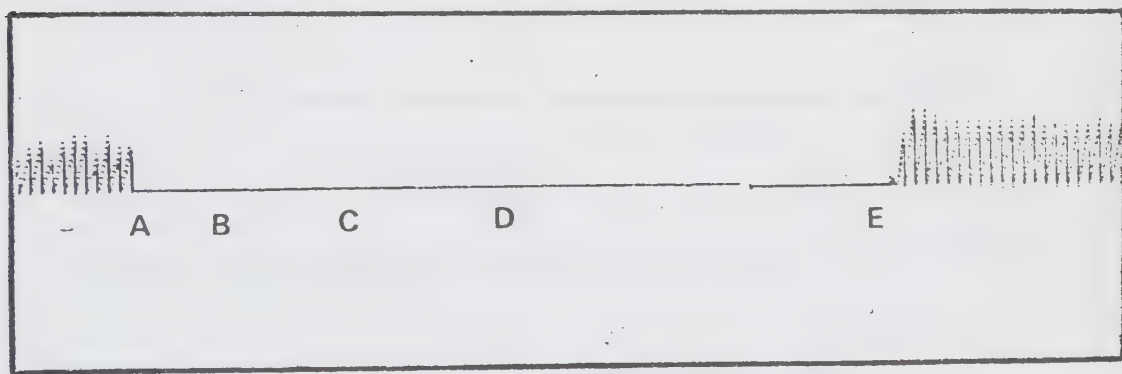
Nous essayons l'effet décontracturant, après morphine, de :

- Bromure de N butyl hyoscine = Buscopan : 1 à 20 mg/kg I.V.
- Sulfate d'atropine : 1 à 4 mg/kg I.V.
- Bromométhylate de l'ester benzilique de la 6-méthoxytropine = Palérol : 5 à 40 mg/kg I.V. (Tropenziline).
- Iodure de α -thiényl-1 phényl-1 N-méthyl morpholinium-3 propane-ol-1 = Viscéralgine : 2 mg/kg I.V. (Tiémonium).

Seul le bromure de N butyl hyoscine a un effet transitoire, mais non nul généralement, ce qui confirme que l'action du corps n° 11 n'est pas un effet "antimorphine" inconnu, car le bromure de N butyl hyoscine n'est pas connu pour avoir un effet antimorphine, ni central, ni périphérique. L'iodure de Tiémonium, l'atropine, le bromométhylate de Tropenziline sont sans efficacité sur ce montage. L'atropine nous semble avoir parfois un effet légèrement défavorable.

Parmi les cholérétiques, nous essayons le nébulisat d'aubier de tilleul obtenu par broyage, solubilisation et filtration de la préparation commerciale (Vibtil) à des doses allant jusqu'à 40 mg/kg I.V. Nous essayons aussi le déhydrocholate de sodium jusqu'à 40 mg/kg I.V.

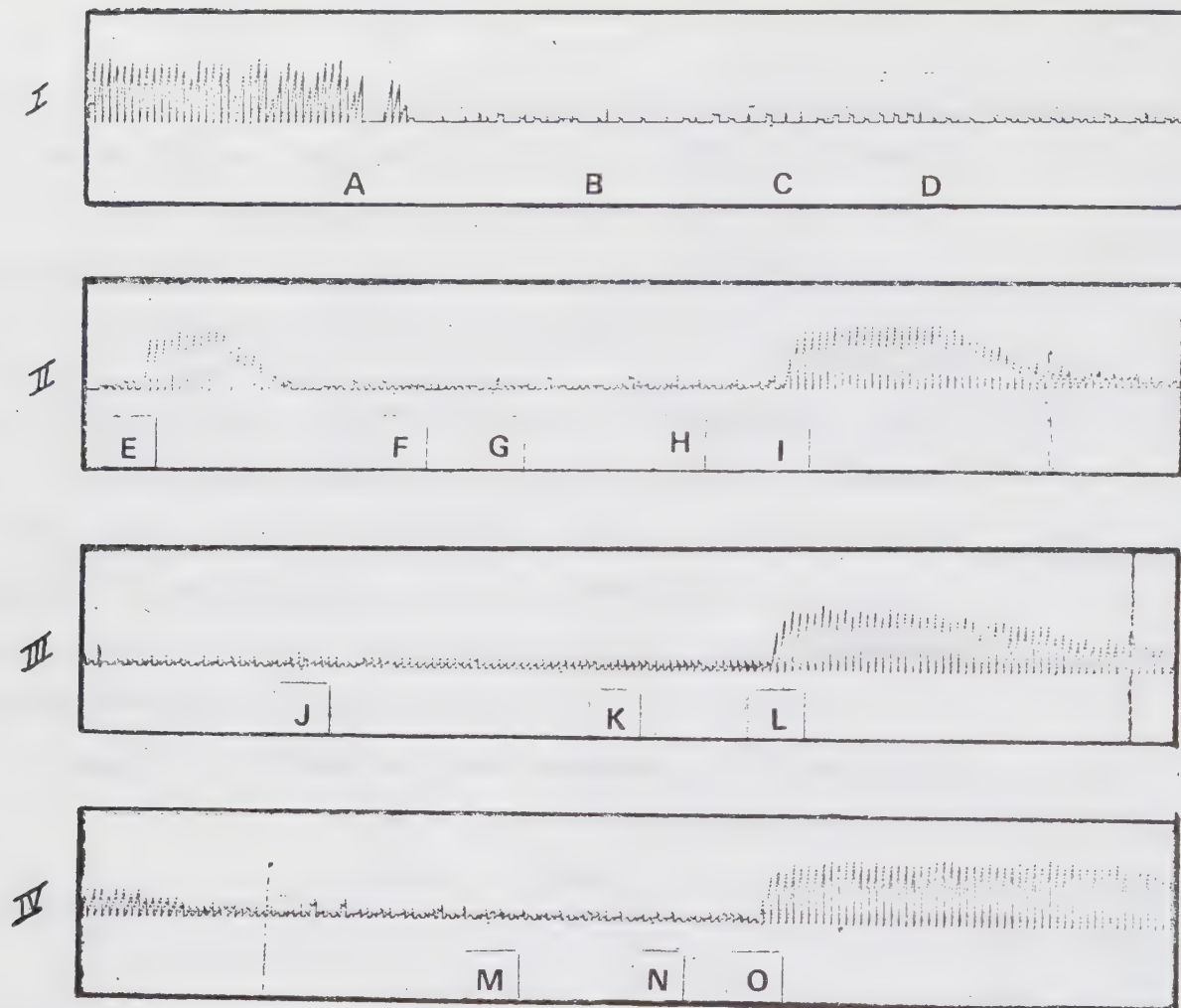
Avec le nébulisat d'aubier de tilleul, nous obtenons des résultats positifs de façon très inconstante. Avec le déhydrocholate : aucun effet, bien que cette dose soit puissamment cholérétique dans les conditions de l'essai sur le cobaye, ce qui montre que dans le cas du corps n° 11, l'apparition ou l'accélération de l'écoulement ne doit rien à l'hypercholérèse. Le tracé n° 9 illustre ces conclusions.



Tracé n° 9

Débit de perfusion du cholécyste - cobaye

- A : morphine : 1 mg/kg I.V.
- B : déhydrocholate de sodium : 10 mg/kg I.V.
- C : déhydrocholate de sodium : 20 mg/kg I.V.
- D : déhydrocholate de sodium : 40 mg/kg I.V.
- E : méthyl 4 ombelliférone : 10 mg/kg I.V.



Tracé n° 10

Débit de perfusion du cholécyste - cobaye

A :	morphine.....	1 mg/kg I.V.
B :	déhydrocholate	40 mg/kg I.V.
C :	atropine.....	1 mg/kg I.V.
D :	atropine.....	2 mg/kg I.V.
E :	méthyl 4 ombelliférone..	10 mg/kg I.V.
F :	Tropenziline.....	5 mg/kg I.V.
G :	Tropenziline.....	10 mg/kg I.V.
H :	Tropenziline.....	40 mg/kg I.V.
I :	méthyl 4 ombelliférone..	20 mg/kg I.V.
J :	N butyl hyoscine.....	20 mg/kg I.V.
K :	Tiemonium	2 mg/kg I.V.
L :	méthyl 4 ombelliférone..	20 mg/kg I.V.
M :	aubier de tilleul.....	20 mg/kg I.V.
N :	aubier de tilleul.....	40 mg/kg I.V.
O :	méthyl 4 ombelliférone..	20 mg/kg I.V.

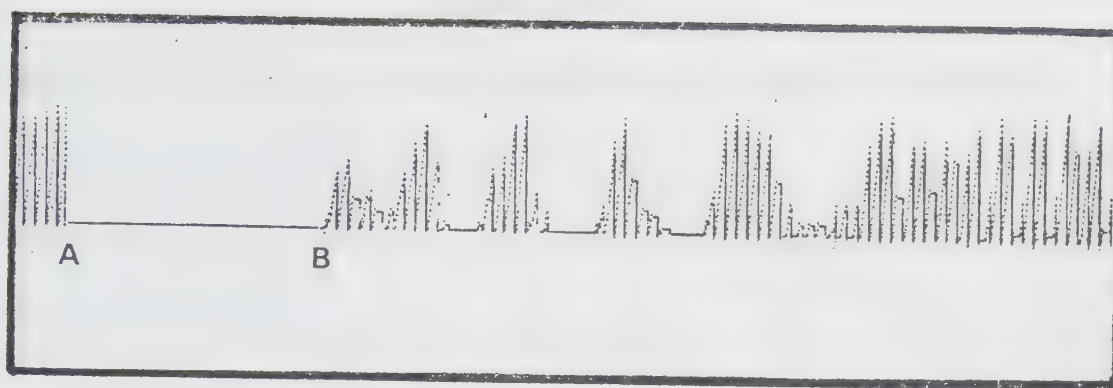
Le tracé de la page précédente représente une seule et même expérience, dont le kymogramme n'a pas été interrompu. Le tracé a été divisé en quatre parties qui se suivent, pour les besoins de la mise en page (I - II - III - IV). Après morphine, le déhydrocholate, l'atropine, le bromométhylate de Tropenziline, le bromure de N butyl hyoscine, l'iodure de Tiémonium, le nébulisat d'aubier de tilleul, sont sans effet. Seul le corps n° 11 donne une réponse positive, mais transitoire. Ce dernier n'étant pas injecté seulement à la fin, mais tout au long de l'expérience, on ne peut pas dire que les autres injections le favorisent : après réponse positive au corps n° 11, les médicaments utilisés précédemment restent sans effet. Le corps n° 11 semble donner, dans ce montage, l'effet le plus constant, le plus puissant, le plus fidèle.

Dans le cas de l'aubier de tilleul nébulisé, nous trouvons une dose minima active de 20 mg/kg par voie I.V., ce qui place en meilleure posture la méthyl ombelliférone. La réponse semble beaucoup moins soutenue que celle du corps n° 11.

Un autre spasmolytique oddien a été récemment décrit [CAHEN - 398 - (loc.cit.)_7]. Il s'agit de la trihydroxy 2-4-6 propiophénone. Nous l'essayons à la dose de 20 mg/kg par voie veineuse, ce qui conduit à un relâchement de faible durée.

5 - Activité de la méthyl 4 ombelliférone sur un contracturant non morphinique du cholécyste.

Nous utilisons la carbacholine, poison parasymphicométique puissant, qui se révèle d'action très inconstante dans la région oddienne. Cependant, sur quelques montages ayant répondu à des doses voisines de 150 µg/kg I.V. le corps n° 11 s'avère aussi spasmodique qu'après la morphine. Particulièrement, 20 mg/kg par voie duodénale, en présence de bile, lèvent le spasme de façon un peu singulière, comme le montre le tracé n° 11. Le sphincter semble s'ouvrir périodiquement avec tendance à l'ouverture totale, le débit conservant cependant un aspect évolutif des poussées de péristaltisme. Il est donc possible d'agir avec la méthyl ombelliférone sur des sphincters normaux, spontanément hypertoniques, bloqués par la morphine et par la carbacholine.



Tracé n° 11

Débit de perfusion du cholécyste - cobaye.

A : carbacholine..... 150 μ g/kg I.V.
B : méthyl 4 ombelliférone..... 20 mg/kg I.V.

Nous résumons l'ensemble de nos travaux sur le cobaye dans les tableaux suivants où l'activité spasmolytique de la méthyl 4 ombelliférone est indiquée en croix selon les conventions décrites lors de l'exposé méthodologique.

Tableau 48

Action de la méthyl 4 ombelliférone après blocage morphinique

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
5 mg/kg	I.V	++±	
5 mg/kg	I.V	0	Après vibtil 5 mg/kg I.V = 0
10 mg/kg	I.V	++±	Après vibtil 10 mg/kg I.V = 0
10 mg/kg	I.V	+±	
10 mg/kg	I.V	+++	Après vibtil 10 mg/kg I.V = 0
10 mg/kg	I.V	+++	
10 mg/kg	I.V	++	
10 mg/kg	I.V	++	
10 mg/kg	I.V	+±	
10 mg/kg	I.V	++±	
10 mg/kg	I.V	++±	Après déhydrocholate 40 mg/kg I.V. = ± (sur un ralentissement)
10 mg/kg	I.V	+++	Après atropine = 0 ; vibtil 20-40 mg/kg I.V = 0
10 mg/kg	I.V	+±	Après déhydrocholate 40 mg/kg I.V ≠ 0
20 mg/kg	I.V	++±	Après buscopan 10 mg/kg I.V = 0
10 mg/kg	I.V	+±	Après vibtil 10 mg/kg I.V = 0
20 mg/kg	I.V	+++	Après vibtil 20 mg/kg I.V = +±
20 mg/kg	I.V	++±	
10 mg/kg	I.V	+	Avec déhydrocholate 40 mg/kg I.V = 0
20 mg/kg	I.V	+±	atropine 2 mg/kg I.V = 0
20 mg/kg	I.V	+±	palérol 5-10-40 mg/kg I.V = 0
20 mg/kg	I.V	++±	buscopan 20 mg/kg I.V = 0
			viscéralgine 2 mg/kg I.V = 0
			vibtil 20-40 mg/kg I.V = 0
10 mg/kg	I.V	++±	Après 10-20-40 mg/kg I.V déhydrocholate = 0
10 mg/kg	I.V	+±	Après vibtil 10 mg/kg I.V = +±
10 mg/kg	I.V	+±	Après vibtil 10 mg/kg I.V = +
10 mg/kg	I.V	+±	
10 mg/kg	I.D	++±	
20 mg/kg	I.D	+++	
50 mg/kg	I.D	++±	

Tableau 49

Action de la méthyl 4 ombelliférone sur les débits spontanés

Sur débit spontané normal ou faible :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
5 mg/kg	I.V	++	Chaque injection donnant un plus fort débit que la précédente.
10 mg/kg	I.V	+++	
20 mg/kg	I.V	++++	
10 mg/kg	I.V	+++	
20 mg/kg	I.V	+++	
30 mg/kg	I.V	+++	
10 mg/kg	I.V	0	
20 mg/kg	I.V	0	
40 mg/kg	I.V	+++	

Sur débit spontané nul (sphincter hypertonique) :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
40 mg/kg	I.D	++++	(la morphine n'arrête pas ce débit très fort)

Tableau 50

Les drogues étalons

1°) Après blocage par la morphine -Déhydrocholate :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
40 mg/kg	I.V	±	(sur une diminution de débit sans arrêt).
40 mg/kg	I.V	±	
40 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
20 mg/kg	I.V	0	Sur ce cobaye, 10 mg/kg I.V. de méthyl
40 mg/kg	I.V	0	4 ombelliférone = ++±

Nébulisat d'aubier de tilleul :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
20 mg/kg	I.V	0	
40 mg/kg	I.V	0	
20 mg/kg	I.V	0	
40 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	+±	
5 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
20 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
20 mg/kg	I.V	+±	

Trihydroxy 2-4-6 propiophénone :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
5 mg/kg	I.V	±	
10 mg/kg	I.V	±	
20 mg/kg	I.V	+	

Atropine :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
1 mg/kg	I.V	diminution	
2 mg/kg	I.V	du débit	
1 mg/kg	I.V	0	
2 mg/kg	I.V	0	
1 mg/kg	I.V	0	
2 mg/kg	I.V	0	

Bromure de N butyl hyoscine :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
1 mg/kg	I.V	0	
2 mg/kg	I.V	±	
10 mg/kg	I.V	+±	
10 mg/kg	I.V	0	(arrêt complet d'un léger débit).
20 mg/kg	I.V	0	

Bromure de Tropenziline :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
5 mg/kg	I.V	0	
10 mg/kg	I.V	0	
40 mg/kg	I.V	0	

Iodure de Tiémonium :

Dose	Voie	Résultat	Commentaires
2 mg/kg	I.V	0	

2°) Sans blocage morphinique :Atropine :

Dose	Voie	Résultat	et	Commentaires
1 mg/kg	I.V	Arrêt complet	sur débit faible.	
2 mg/kg	I.V	Arrêt complet.		
2 mg/kg	I.V	Après méthyl 4 ombelliférone :	très nette diminution.	

Déhydrocholate :

Dose	Voie	Résultat et commentaires
10 mg/kg	I.V	0
20 mg/kg	I.V	+++ Arrêt par la morphine 1 mg/kg I.V.

En conclusion, il est apparu nécessaire de compléter ces résultats remarquables par leur homogénéité, en passant sur une autre espèce : le chien.

b) Sur le chien :

Le débit de perfusion normal a souvent, sur cette espèce, un caractère rythmique, contrairement au débit régulier observé chez le cobaye. Mais, chez le chien, les essais sont délicats : plus de la moitié des préparations se révèle inutilisable : débit de base complètement irrégulier, incidence de la respiration de l'animal, effet incertain des agents spasmogènes. Cependant, quelques préparations donnent des résultats techniquement indiscutables.

Dans un premier temps, nous vérifions sur un chien dont le sphincter d'Oddi est naturellement hypertonique, que l'injection intraveineuse d'un soluté physiologique à pH 9,5 ne rétablit pas le débit de perfusion. De même, compte tenu du fait que les injections de méthyl 4 ombelliférone sont légèrement hypotensives, nous vérifions que cette réaction vasculaire ne conduit pas à un relachement des fibres sphinctériennes : sur un chien à débit oddien très faible l'injection de substances hypotensives non spasmolytiques (ganglioplégiques par exemple) ne rétablit pas le débit normal.

Les résultats sont très parallèles à ceux obtenus sur le cobaye :

- Sur des chiens à débit spontanément très faible, l'injection I.V. de méthyl 4 ombelliférone sodée (entre 20 et 50 mg/kg) déclenche une réponse importante, le débit de perfusion restant souvent définitivement très élevé (plus de 2 heures). Dans un cas, l'effet de 20 mg/kg est

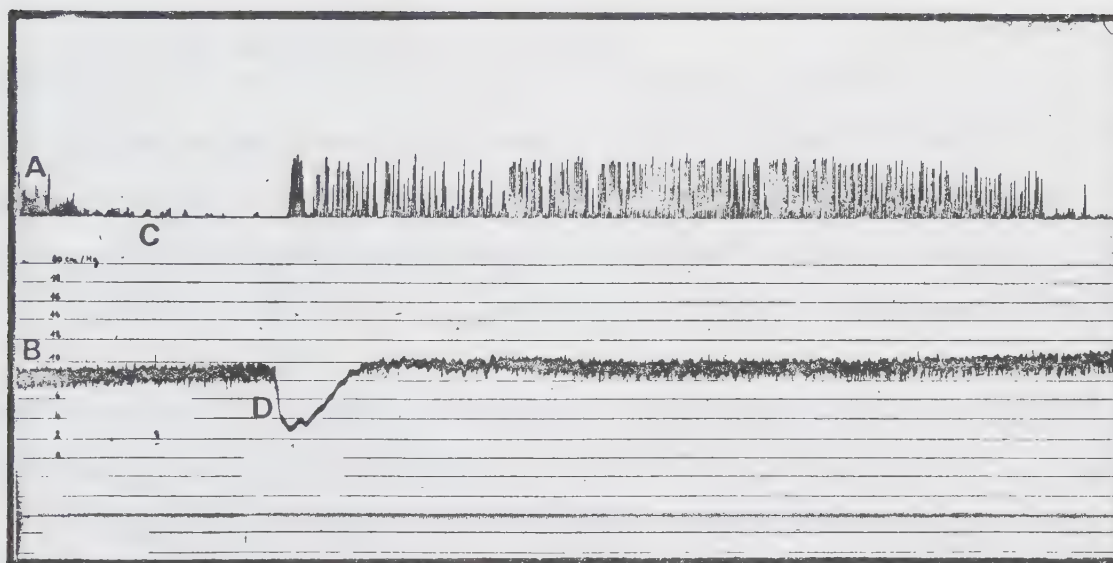
maximum pendant 30 minutes et trois injections successives conduisent chaque fois à la répétition de la réponse. Dans un autre essai, l'injection de 10, puis 20, puis 50 mg/kg donne une réponse proportionnelle à la dose.

- Après 1 mg/kg I.V de chlorhydrate de morphine, le spasme oddien subséquent est levé régulièrement avec 20 mg/kg du corps n° 11. Dans un cas où il a fallu injecter deux fois 1 mg/kg de morphine, la dose spasmolytique du dérivé étudié fut aussi de 20 mg/kg. Dans tous ces cas, le débit rétabli est toujours très important, le plus souvent très supérieur au débit de perfusion initial. Il y a, dans cette espèce, une grande remanence de l'effet spasmolytique du produit.
- Après 25 µg/kg de carbacholine, il faut atteindre 70 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone pour obtenir un très bon déblocage oddien.

Le tracé suivant illustre nos conclusions.

Tracé n° 12

Débit de perfusion du cholécyste - Chien



A : débit de perfusion

B : tension artérielle

C : le débit se tarit spontanément

D : méthyl 4 ombelliférone : 20 mg/kg I.V.

En conclusion de ces études sur la modification de la tonicité de l'appareil oddien sous l'influence du corps n° 11, nous pouvons préciser que :

- 1 - Le produit rétablit, sur deux espèces, le chien et le cobaye, la tonicité normale des sphincters naturellement contractés et non perméables.
- 2 - Le produit s'oppose à l'effet contracturant de la morphine. Cet effet est durable : il apparaît pour des doses de 10 mg/kg chez le cobaye et 20 mg/kg chez le chien. Sur le cobaye, nous avons vérifié qu'il s'agit d'un effet à la fois curatif et préventif.
- 3 - Le produit n'agit pas seulement comme un "antimorphine". Il est capable de lever les spasmes induits par l'acétylcholine et la carbacholine, sur les deux espèces étudiées.
- 4 - Les spasmolytiques majeurs (atropine, bromure de N butyl hyoscine, etc...) ont peu d'effet dans cette région oddienne. Nos résultats confirment les conclusions de ROBELET (1963) - 469 - qui, utilisant le même montage, attribue une très faible activité à l'atropine, même à des doses atteignant le mg par kg de poids corporel.
- 5 - Les drogues papavériniques (papavérine, aminopromazine) ont une activité proche de celle de la méthyl 4 ombelliférone.
- 6 - La méthyl 4 ombelliférone paraît - sur le cobaye - plus efficace que les deux produits récemment présentés dans cette indication pharmacodynamique : nébulisat d'aubier de tilleul et trihydroxypropionphénone.

3 - CONCLUSION SUR L'ETUDE DES EFFETS SPASMO- LYTIQUES DU CORPS N° 11 -

Trois domaines sont explorés :

- le domaine viscéral digestif
- le domaine vasculaire
- le domaine cholécystique.

- . Au niveau intestinal, le produit se présente comme un spasmolytique musculotrope papavérinique de faible activité, tant in vivo qu'in situ sur l'animal entier. Il est, dans ce domaine, très inférieur à beaucoup de réactifs pharmacologiques puissants : atropine, bromure de N butyl hyoscine et aminopromazine. Sur un agent spasmogène choisi, la morphine, le produit est très peu actif, de façon brutale mais de très courte durée, ce qui contraste avec l'effet non moins puissant, mais très prolongé, observé avec les spasmolytiques majeurs ci-dessus cités.
- . Dans le domaine vasculaire, l'hypotension observée est d'assez courte durée ; elle est due à un effet vasodilatateur périphérique que l'on peut attribuer à l'activité papavérinique du produit. Cet effet vasculotrope faible se retrouve au niveau des coronaires.
- . Au niveau du cholécyste, on peut conclure que le produit n'est pas un cholagogue. Au contraire, il a un net effet de relaxation de la vésicule biliaire. Dans la zone oddienne, le corps n° 11 est un puissant spasmolytique dont l'effet a été contrôlé sur deux espèces. Le produit agit aussi bien par voie orale que parentérale. Son effet est durable avec des doses minimales

au-dessous des doses actives des meilleurs réactifs pharmacodynamiques. Les spasmolytiques moyens à tropisme viscéral, de type atropinique, semblent beaucoup moins efficaces dans cette sphère oddienne. La méthyl 4 ombelliférone est au contraire peu active dans le domaine intestinal. En utilisant une même espèce : le chien, et un même contracturant : la morphine, il est très net que les spasmolytiques majeurs sont très puissants sur les tuniques intestinales et peu actifs dans la région oddienne, alors que c'est exactement l'inverse pour le corps étudié. Ce rapprochement peut nous permettre d'avancer le concept d'une "électivité d'action oddienne" de la méthyl 4 ombelliférone. Il reste à expliquer cette électivité inattendue. La dernière partie de ce travail y sera consacrée.

IV - HYPOTHESES SUR LES MECANISMES D'ACTION

DU CORPS N° 11

Au total, deux activités essentielles peuvent être attribuées à la méthyl 4 ombelliférone à la suite des recherches précédentes :

- un effet cholérétique
- un effet spasmolytique oddien.

Nous tenterons d'avancer, dans cette dernière partie de notre travail, quelques hypothèses pouvant contribuer à expliquer ces réponses pharmacodynamiques.

1°) LES MECANISMES DE L'HYPERCHOLERESE - LE CAS DE LA METHYL 4 OMBELLIFERONE -

Rappelons que le corps étudié est un cholérétique vrai, non cholécystokinétique tel que l'entendent CAROLI et coll. (1962) - 470 -. De nombreuses causes peuvent augmenter la fonction exocrine du foie. CHABROL et CHARONNAT ont fait le point de la question - 426 - (loc.cit.). Nous pouvons nous inspirer de ce travail dans notre étude.

// A - Le débit biliaire peut s'élever lorsque le débit sanguin //
// hépatique s'accroît - Est-ce le cas du corps n° 11 ? //

WAKIN et MANN (1942) - 471 - puis BIZARD et VANLERENBERGHE - 382 - (loc.cit.) ont précisé l'importance de ce facteur. De nombreuses méthodes ont été proposées pour contrôler les variations de débit sanguin dans le foie, toutes évitant l'emploi de circulations extracorporelles :

- Méthode basée sur l'étude des courbes de première circulation d'un colorant vital selon STEKIEL (1960) - 472 -.
- Méthode ne nécessitant pas l'ouverture des artères, utilisant des débit-mètres électromagnétiques, ou basée sur l'effet Doppler.
- Méthode utilisant des sondes thermiques insérées dans la veine porte, l'artère hépatique et les veines sus-hépatiques, selon ZOCKLER (1965) - 473 -.

Nous n'avons pu disposer d'un tel matériel qui nous aurait permis de donner des valeurs expérimentales. Cependant, il faut noter que la première cause d'élévation de débit sanguin dans un organe quelconque est le maintien, et même l'élévation de la pression de perfusion de l'organe. Dans ce cas, l'étude de la pression systémique donne un bon reflet de la situation hémodynamique locale. Il faut citer ROBELET et GUERRIN - 433 - (loc.cit.) qui montrent que l'hypotension artérielle réduit l'élimination biliaire. Le corps n° 11 est hypotenseur, rappelons le, sur toutes les espèces étudiées (rat - chat - chien), et ce, aux doses cholérétiques : entre 10 et 50 mg/kg. L'hypercholérèse est probablement due à d'autres facteurs qu'à l'élévation du débit sanguin hépatique.

// B - Le système nerveux autonome est-il impliqué dans la /
// réponse cholérétique de la drogue ? //

L'hypercholérèse pourrait être favorisée par une modification du tonus du système nerveux autonome, ne serait-ce que par les variations locales de vasomotricité qu'elle peut entraîner.

Nous avons déjà vu que la méthyl 4 ombelliférone est douée d'une faible activité papavérinique. GAZET du CHATELIER et coll.

- 233 - (loc.cit.) concluent à un effet "ganglioplégique et post-ganglionnaire" de cette substance, à fortes doses. Nous cherchons à confirmer ce point.

Nous vérifions que sur le chien chloralosé (0,1 g/kg I.V.) dont la tension artérielle est enregistrée par voie sanglante, des doses intraveineuses de 50 mg/kg de sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone sont sans effet sur l'hypertension déclenchée par de hautes doses d'acétylcholine (0,5 mg/kg par voie I.V.), l'animal étant par ailleurs fortement atropiné (2 mg/kg par voie I.V.). Nous vérifions que, sur une telle préparation, 5 mg/kg de bromure de tétra éthyl ammonium bloquent l'hypertension pendant 15 minutes, par effet sympathicolytique ganglionnaire (essai conduit sur 3 chiens).

Sur un autre chien endormi au chloralose, bivagotomisé et mis en respiration artificielle, l'injection de 20 mg/kg I.V. du corps n° 11 ne modifie pratiquement pas l'hypertension déclenchée par excitation du nerf splanchnique, même après bisurrénalectomie.

Enfin, sur des chats anesthésiés au mébubarbital (40 mg/kg I.V.), l'excitation électrique du nerf cervical sympathique supérieur (filet pré et filet post-ganglionnaire), déclenche une contraction de la membrane nictitante. A des doses atteignant 60 mg/kg I.V., le sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone ne modifie pas la réponse électrique pré et post-ganglionnaire (deux montages). Le produit nous semble dénué d'effet sur les ganglions sympathiques, en particulier aux doses cholérétiques.

Il en est de même dans les autres étages du système sympathique et dans le domaine parasympathique : sur le chien chloralosé, l'injection de 10 à 30 mg/kg du produit par voie intraveineuse, ne modifie pas la réponse tensionnelle à :

- l'injection de 20 µg/kg d'acétylcholine
- l'excitation du bout périphérique du nerf vague sectionné au cou
- la mise en jeu du réflexe oculo-cardiaque
- l'occlusion des deux carotides communes
- l'injection de 5 à 10 µg/kg I.V. d'adrénaline et noradrénaline
- l'injection de 500 µg/kg I.V. de tyramine.

De même, l'hypotension observée par injection de 10 à 50 mg/kg du produit n'est pas affectée par injection de 1 mg/kg I.V. d'atropine et 1 mg/kg de yohimbine (six montages). Le corps ne doit son hypotension qu'aux effets vasculotropes papavériniques. Les modifications du tonus sympathique ou parasympathique ne peuvent être invoquées pour expliquer l'effet cholérétique de la drogue.

Il faut d'ailleurs noter réciproquement que CHABROL et CHARONNAT ont déjà conclu que l'atropine, l'acétylcholine et la yohimbine sont incapables de modifier la réponse cholérétique du chien à l'atophan (1929) - 474 -.

/ C - Thermogénèse, biligénèse et corps n° 11 /

Il est connu que l'élévation de la température centrale favorise la biligénèse, comme l'ont indiqué BIZARD et coll. - 450 - (loc.cit.). Certains auteurs ont observé une hyperthermie sous l'action des hydroxy 4 coumarines, essentiellement parmi les anticoagulants, et l'ont rapportée à un effet de type dinitrophénol. Nous avons rappelé ces recherches dans le chapitre II p. 172. Qu'en est-il au sujet du corps n° 11 ? Bien entendu, la méthyl 4 ombelliférone n'est pas une hydroxy 4 coumarine. Il est apparu cependant intéressant de vérifier l'absence d'effet hyperthermisant de ce composé.

Des lots de trois chiens adultes de race commune, anesthésiés au mébubarbital intraveineux (40 mg/kg) reçoivent, par voie veineuse, 2/3 de la dose létale 50 I.V. souris. Cette dose forte donne, avec les hyperthermisants, une élévation thermique importante surveillée grâce à la mise en place d'une sonde rectale.

- Avec 166 mg/kg du sel sodique du corps n° 11, aucune hyperthermie n'est notée dans les trois heures qui suivent l'injection.
- Avec 83,3 mg/kg du sel sodique de la Warfarine :
 - . un chien n'a pas d'hyperthermie
 - . un chien a une nette réaction positive (+ 2,4° C)
 - . un chien meurt d'hyperthermie (à 43° C) avec polypnée intense terminale et une Rigor mortis très caractéristique des effets du dinitrophénol.

Au total, la méthyl 4 ombelliférone n'est pas hyperthermisante ; on ne peut invoquer ce facteur comme explication de l'activité cholérétique du corps.

// D - La voie biliaire est-elle une des voies d'élimination du /
// corps n° 11 ? //

L'élimination hépatique des médicaments conduit à une stimulation de l'excrétion biliaire. KOSS, BEIZENHERZ et coll. (1965) - 475 - ont constaté que dans le cas du phényl 1 hydroxy 1 pentane, corps cholérétique chez le rat, l'hypercholérèse est proportionnelle à la concentration biliaire du produit et de ses métabolites. Chez le lapin, le métabolite est un glucuronide non éliminé dans la bile : le corps n'est pas cholérétique sur cette espèce.

Nous sommes donc amenés à étudier les voies d'élimination de la méthyl 4 ombelliférone. La glycuroconjugaison est un stade de détoxication habituel pour les coumarines [TECWYN WILLIAMS - 435 - (loc.cit.)_7]. La méthyl 4 ombelliférone donne, chez le lapin, un glycuroconjugué urinaire très abondant, au point que cette voie a été proposée comme moyen de synthèse biologique pour récupérer en quantité ce métabolite - 445 - (loc.cit.). Qu'en est-il au niveau hépatique et chez le rat où la réponse cholérétique est nette ?

1 - Méthode d'étude de l'excrétion biliaire du produit :

α) Protocole :

Dix rats mâles adultes de souche Wistar pesant 225 g en moyenne sont endormis à l'uréthane (1 g/kg par voie péritonéale). La bile est recueillie par cathétérisme selon le schéma indiqué dans le troisième chapitre. Nous donnons, toujours par voie duodénale, 50 mg/kg du sel sodique de

la méthyl 4 ombelliférone en solution aqueuse. La bile est recueillie toutes les heures pendant les six heures suivant l'injection du produit. Nous recherchons et dosons dans chaque échantillon :

- . la méthyl 4 ombelliférone libre
- . le glycuconjugué correspondant.

β) Dosage du dérivé libre :

Par fluorescence avec simple dilution de la bile dans un tampon pH 10,5. Ce tampon est obtenu par mélange de deux solution A + B en parties égales sous contrôle du pH-mètre.

<u>Solution A</u> :	Glycocolle	0,1 M
	Cl Na	0,1 M
<u>Solution B</u> :	Soude	0,1 N.

A ce pH, la fluorescence est maxima pour une λ d'excitation de 370 m μ : (réémission à 468 m μ). La courbe de dilution étalon est préparée de la même façon entre 0,01 et 0,1 μ g/ml, en utilisant toujours le dérivé sodé de la méthyl 4 ombelliférone, les résultats quantitatifs étant par la suite exprimés de cette façon. Un blanc est conduit sur le tampon. La quantité de 0,01 μ g/ml donne la limite inférieure de la sensibilité du dosage.

σ) Dosage du glycuconjugué :

Premier temps : hydrolyse. Nous mélangeons :

- 0,1 ml de bile
- 0,1 ml de tampon acétate pH 5,2 comportant :
 - . Solution A : acide acétique 3 % dans eau distillée
 - . Solution B : acétate de sodium 10 % dans eau distilléemélange sous contrôle du pH-mètre.
- 0,1 ml de suc d'Helix Pomatia (fournisseur I.B.F)
contenant 10.000 unités de glucuronidase
- 1 goutte de toluène.

Le tout est abandonné 24 heures à 37° C.

Deuxième temps : le dosage final est conduit selon la technique décrite pour le corps libre après repassage dans le tampon pH 10,5

δ) Caractérisation du corps n° 11 :

Une partie de cette dernière solution à pH 10,5 est ramenée à pH 3 avec l'acide chlorhydrique dilué.

10 ml de cette solution acide sont extraits avec le mélange suivant :

- Chloroforme 10 ml
- Méthyl iso butyl cétone 2,5 ml.

Après agitation 30 minutes au va-et-vient et soutirage, les solvants organiques sont évaporés sous trompe à vide au bain-marie jusqu'à obtention d'une goutte de résidu. Nous posons cette goutte sur une plaque de chromatographie en verre où nous avons étalé de la silice à l'acétate de sodium

(40 g de silice en suspension dans 80 ml de solution d'acétate de sodium 0,3 M - évaporation). Les dimensions de la plaque sont de 20 x 20 cm.

La migration est assurée dans le solvant suivant :

- toluène	50
- formiate d'éthyl	40
- acide formique	10

Migration sur 10 cm avec témoin de solution pure de méthyl 4 ombelliférone en solution alcoolique. Les taches sont repérées par leur fluorescence bleue en lumière de Wood. Rf dans ces conditions : 0,5.

En complément, le produit est récupéré en grattant la couche siliceuse au niveau de la tache. On extrait par 4 ml de solution ammoniacale à 3 % dans l'eau distillée. Après une agitation de 10 minutes, en tubes à centrifuger bouchés, nous centrifugeons pendant 10 minutes et récupérons le surnageant. Le spectre U.V. est tracé automatiquement, (spectrophotomètre enregistreur Leres), le blanc de solution étant pris en grattant une surface identique de silice vierge sur la même plaque de chromatographie et au niveau atteint par le corps n° 11.

Deux maxima sont caractérisées à :

- 229 ± 1 m μ
- 360 ± 1 m μ

qui doivent être retrouvées sur la solution provenant de la tache de l'extrait biliaire et de celle provenant de l'étalon de la méthyl 4 ombelliférone.

2 - Résultats :

- Dès la première heure suivant le traitement, le produit est dans la bile du rat, comme en témoignent les chromatographies sur silice et la caractérisation spectrophotométrique en U.V. A noter de plus que la drogue apparaît dans les quelques minutes qui suivent l'injection intraduodénale, puisque la bile prend alors une fluorescence bleue caractéristique en lumière de Wood. C'est le produit lui-même qui est fluorescent et non son glycuconjugué. Il est encore présent quoique peu détectable à la fin de l'essai (sixième heure). Le glycuconjugué est aussi présent en abondance, comme le témoignent les résultats des essais suivant hydrolyse.
- Les dosages exécutés pendant 6 heures sur les 10 rats donnent les valeurs moyennes suivantes (tableau 51).
Poids moyen des rats : 224 g - quantité donnée par rat, en moyenne : 11,2 mg.

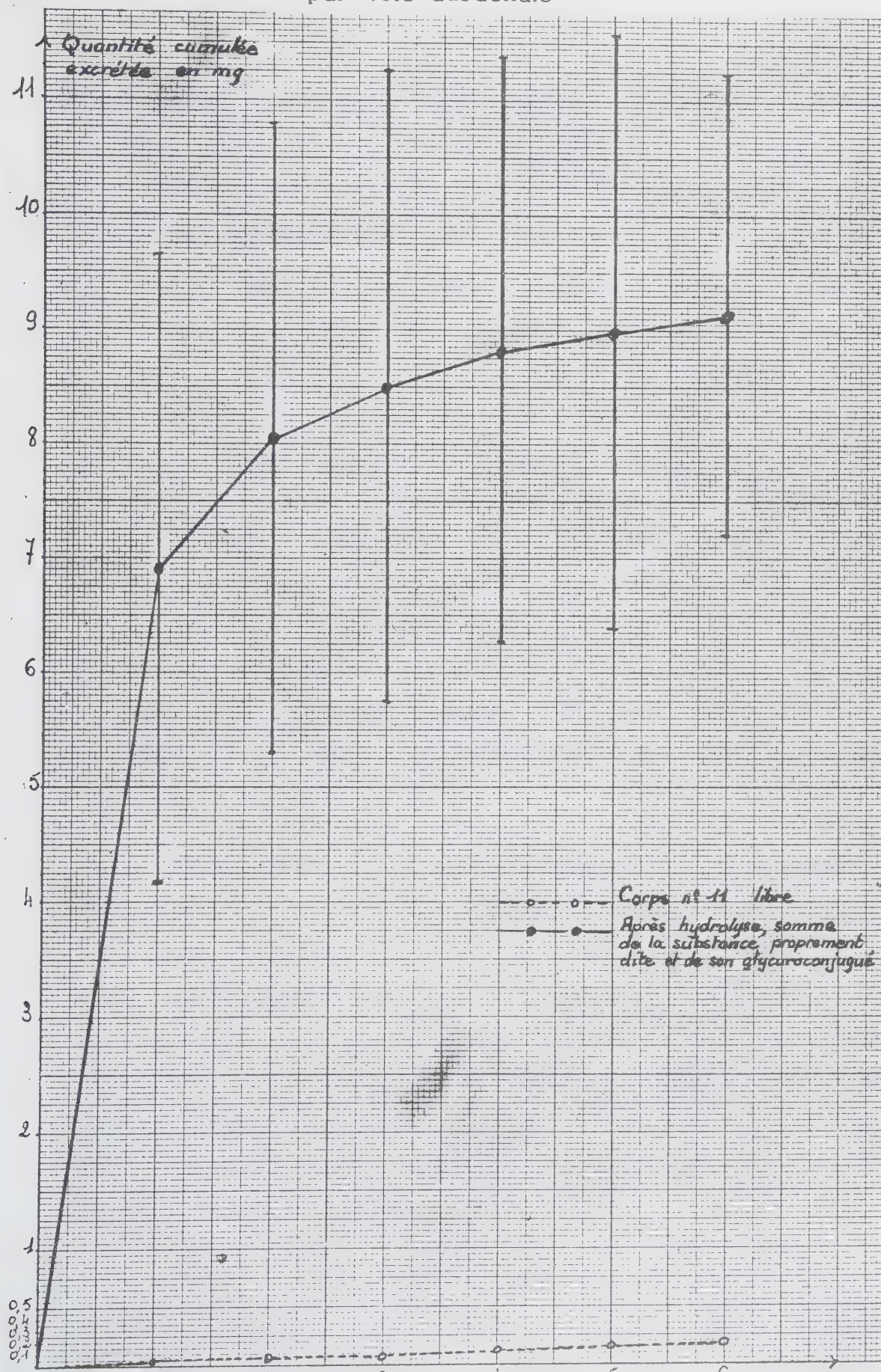
Tableau 51

Excrétion biliaire du corps n° 11 chez le rat
après administration de 50 mg/kg par voie duodénale

	Horaire des prélèvements						% de récupération du corps n°11 libre	% de récupération du corps N°11 après hydrolyse du glycuconjugué (en 6 h)
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	
Débit biliaire en ml/h.		0,8	0,5	0,46	0,44	0,41	0,43	
Quantité du corps n° 11 libre en µg/h	Injection duodénale - 50 mg/kg	97,9	33,2	15,8	7,9	4,8	4	
Quantité totale du corps n°11 libre en µg/h		97,9	131,1	146,9	155	159,8	163,8	1,43
Quantité de corps n°11 après hydrolyse en µg/h		6826,5	1247	530	336,6	213,5	153,1	
Quantité totale du corps n°11 excrétée après hydrolyse en µg/h		6826,5	673,5	603,5	940,1	9153,6	9306,8	82,2

Le graphique n° 11 montre l'évolution cumulative de l'excrétion biliaire de la méthyl 4 ombelliférone et de son glycuconjugué dans les six heures suivant l'injection intra-duodénale de 50 mg/kg du produit. Chaque point est la moyenne de 10 essais. Les tirets verticaux représentent plus ou moins un écart-type pour chaque moyenne horaire.

Evolution cumulative de l'excrétion biliaire moyenne du rat endormi
après traitement avec 50 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone sodée
par voie duodénale



Ce tableau fait apparaître nettement la présence du corps n° 11 libre mais en petite quantité et la grande importance de la conjugaison dans le passage hépatique du produit. En six heures, 82,2 % de la dose donnée passent ainsi dans le foie.

Notons que, chez le cobaye, au cours des divers essais sur l'étude de la spasmolyse oddienne, il est possible de confirmer aussi la présence du corps n° 11 dans les minutes suivant l'administration du produit, grâce à l'apparition d'une fluorescence bleue caractéristique de la bile en lumière de Wood. Il s'agit bien de la substance elle-même et non du glycuconjugué qui n'est pas fluorescent. Chez le chien, après 50 mg/kg du sel sodique et par voie duodénale, utilisant la méthode de caractérisation et de dosage décrite à propos du rat, nous trouvons dans la première heure suivant le traitement, une concentration biliaire de substance pure de 500 µg/ml (essai sur trois montages). Ce taux est relativement voisin de celui trouvé chez le rat (97 µg/ml).

En conclusion de cette étude du mécanisme d'action cholérétique du corps n° 11, nous pouvons préciser que cet effet ne doit probablement rien aux modifications de l'hémodynamique vasculaire ou du tonus des systèmes réglant la vie végétative, qu'il n'est pas lié à une élévation de la thermogénèse centrale. Par contre, le foie étant un des lieux de détoxication du produit par glycuconjugaison, la bile en contient une grande quantité. Cette concentration hépatique peut contribuer, selon les auteurs, à expliquer la stimulation du pouvoir excréteur du foie.

2°) LE POUVOIR SPASMOLYTIQUE ODDIEN DE LA

SUBSTANCE N° 11 -

TENTATIVES D'EXPLICATION DU MODE D'ACTION -

Nous rappelons qu'il nous paraît possible de parler d'une "électivité d'action spasmolytique oddienne" du composé n° 11.

// A - Des raisons anatomiques permettent-elles d'expliquer cette //
// localisation des effets de la méthyl 4 ombelliférone ? //

Il existe de grands rapports anatomiques et fonctionnels entre le sphincter d'Oddi et la région intestinale de son implantation.

COSCO-MONTALDO (1964) - 476 - a fait récemment le point à ce sujet. La pharmacologie clinique humaine montre qu'un abaissement du tonus duodénal peut entraîner le même effet sur les voies biliaires, par exemple avec le spasmolytique Métoclopramide

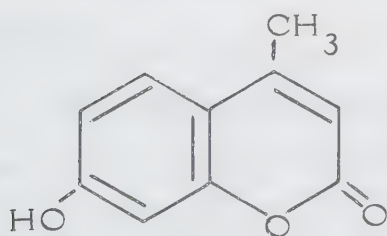
[MARTH (1966) - 477 -]. Rappelons que le corps n° 11 est un spasmolytique - quoique faible - sur l'intestin. Notons qu'à l'inverse DUX et coll. pensent qu'il existe une indépendance motrice des deux systèmes chez l'homme (1960) - 478 -.

Cependant CREMA - 451 - (loc.cit.) indique que la structure histologique des fibres musculaires de l'Oddi et le type d'implantation du sphincter dans le duodénum varient beaucoup d'une espèce à l'autre. Précisément, d'après cet auteur, chez le chien, le cholédoque parcourt un long trajet dans la tunique intestinale avant de déboucher dans sa lumière : les rapports Oddi - fibres intestinales sont étroits. C'est le contraire pour le cobaye, où l'implantation du cholédoque est perpendiculaire à la tunique intestinale,

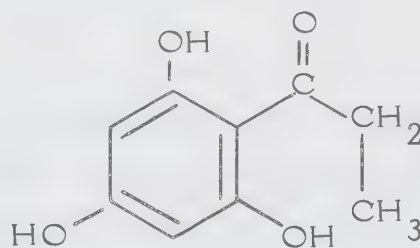
les rapports anatomiques étant réduits au minimum. Et justement, le cobaye et le chien se comportent, dans nos essais, de semblable façon vis-à-vis de la méthyl 4 ombelliférone. Des dispositions anatomiques particulières ne permettent pas d'expliquer l'électivité spasmolytique oddienne de la drogue.

/ B - Activité oddienne et structure chimique /

Quelques substances sont réputées actives sur les spasmes oddiens. En dehors de la méthyl 4 ombelliférone, citons la trihydroxypropionophénone et le nébulisat d'aubier de tilleul. Ce groupe paraît bien hétérogène. Il ne semble pas exister de relations structurales entre ces divers produits. Cependant, la formule de la trihydroxypropionophénone peut faire figure de cycle ouvert (ou "potentiel") rappelant une chromone, corps structuralement apparenté aux coumarines.



Corps n° 11



Trihydroxy 2-4-6 propiophénone

Enfin, le nébulisat d'aubier de tilleul est, bien entendu, un mélange très complexe. Cependant, TARBOURIECH (1962) - 479 - dans sa thèse, analysant par chromatographie cet extrait végétal, trouve - sans y accorder beaucoup d'importance - une grande quantité de dérivés coumariniques. Sans pouvoir aller plus loin pour le moment, disons qu'il est possible qu'il existe quelques relations structurales permettant d'expliquer l'activité oddienne de certaines préparations, la structure des benzo pyrones pouvant être le lien entre elles.

/ C - Morphine et région oddienne /

La morphine est l'agent contracturant le plus fidèle de la région oddienne, et ceci sur toutes les espèces. Il vient rapidement à l'esprit que la spasmolyse observée pourrait être liée à un effet strictement "antimorphine", d'autant que CREMA et coll. (1965) - 480 - ont remarqué que l'effet de la morphine est peu modifié par les atropiniques, mais bien par la nalorphine, inhibiteur général des effets du stupéfiant. Rappelons cependant que la méthyl 4 ombelliférone, tant chez le chien que chez le cobaye, lève aussi les spasmes déclenchés par l'acétylcholine et la carbacholine et libère les sphincters continents par hypertonie naturelle. Il n'y a pas de relation exclusive entre morphine, sphincter d'Oddi et méthyl 4 ombelliférone.

// D - L'altération des mécanismes adrénergiques, dont celle des médiateurs sympathiques, est-elle en cause ? //

Tous les auteurs accordent, dans la régulation de la motricité oddienne, une pré-éminence au mécanisme sympathique. Citons PASECHNIK (1959) - 481 -, CREMA et BERTÉ (1963) - 482 -. Ces derniers auteurs concluent même à la présence de récepteurs de type alpha constricteur et de type bêta dilatateur (1965) - 483 -.

Rappelons tout d'abord que le corps n° 11 semble dénué d'effet sympatholytique, comme nous l'avons montré dans le précédent paragraphe de ce chapitre où sont étudiées les diverses raisons pouvant expliquer l'effet cholérétique de la drogue.

D'autres mécanismes lytiques peuvent intervenir : par exemple la vidange des stocks périphériques des catécholamines tissulaires ou le blocage de la synthèse de ces médiateurs. Dans le premier cas, l'effet serait celui de la guanéthidine ou de la réserpine. Il s'accompagne toujours de la potentialisation des effets tensionnels de la noradrénaline et de l'adrénaline injectées par voie veineuse : ce qui n'est pas le cas, nous l'avons vu, pour le corps n° 11. De plus, cette inhibition du tonus sympathique demande un certain temps de latence, et nous voyons que l'effet oddien du corps n° 11 est instantané. Dans le cas du blocage de la synthèse des catécholamines, l'effet rapprocherait le corps de l'alpha méthyl dopa, dont l'action n'est pas instantanée. Cependant, nous avons eu notre attention attirée par les travaux de HARTMAN - 231 - (loc.cit.) qui montre que l'acide caféique et certaines coumarines bloquent, in vitro, l'activité de la dopa-décarboxylase. Qu'en est-il du corps n° 11 structuralement voisin ?

Méthode

Nous utilisons celle décrite par SOURKES - 230 - (loc.cit.) qui mesure le dégagement d'anhydride carbonique produit par décarboxylation de la dihydroxyphénylalanine (Dopa) sous l'action de la décarboxylase du rein de cobaye. Un inhibiteur de cet enzyme diminue le dégagement gazeux. Après broyage de reins de cobayes fraîchement tués, nous mettons en contact dans une fiole de Warburg :

- 1 - une partie de solution de Dopa donnant une concentration finale molaire
250
- 2 - une partie d'un tampon phosphate (phosphate monopotassique + phosphate disodique) à pH 6,8

- 3 - l'inhibiteur éventuel (corps n° 11 ou alpha méthyl dopa - étalon) qui est ajouté dans certains équipages de façon à obtenir la concentration terminale de 1×10^{-3} Molaire
- 4 - les fioles ont leur ajutage latéral rempli d'une partie de solution d'enzyme obtenue par récupération du surnageant après centrifugation à froid (4°C) du broyat rénal précédent.

Certaines fioles ne contiennent que les tampons et servent de thermobaromètres.

Toutes les fioles sont fixées à leur micromanomètre respectif et plongées dans le bain-marie à 37° . L'agitation dure 10 minutes pour équilibration, puis la solution d'enzyme, disposée dans l'ajutage latéral, est mise en contact avec la solution tamponnée comportant le substrat. Le temps de dégagement est de 20 minutes, après quoi, la lecture des manomètres, suivie des corrections de température et de pression, donnent la valeur du dégagement gazeux.

Résultats

Ils sont résumés dans le tableau suivant (n° 52).

Tableau 52

Dégagement gazeux par attaque de la dopa décarboxylase sur la dopa in vitro
 Inhibition respective de l'alpha méthyl dopa et
 de la méthyl 4 ombelliférone sodée, à $1 \times 10^{-3} \text{ M}$

	Dopa	Dopa + alpha méthyl dopa $1 \times 10^{-3} \text{ M}$	Dopa + corps n° 11 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$
Volume de CO_2 dégagé en μl	57	16,4	54,6
Pourcentage d'inhibition du dégagement de CO_2		71 %	5 %
Valeurs procentuelles respectives		100	7

L'inhibition de la dopa décarboxylase par la méthyl 4 ombelliférone ne représente que 7 % de celle de la même concentration molaire d'alpha méthyl dopa. Nous ne pouvons donc invoquer, de toutes façons, cet effet particulier de certaines coumarines pour expliquer l'activité spasmolytique oddienne du corps n° 11.

Dans un ordre d'idées diamétralement opposé, mais tout en restant dans le domaine adrénargique, nous recherchons un effet sympathicomimétique béta du corps n° 11 selon l'hypothèse avancée par CREMA - 482 - (loc.cit.).

Sur un chat endormi par injection péritonéale de 25 mg/kg de mébubarbital sodique, la tension artérielle est enregistrée par voie sanglante.

- L'injection intraveineuse de 20 mg/kg du sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone donne une hypotension de 5 cm de mercure, durant 3 à 5 minutes. Cette dose est celle qui débloque le sphincter d'Oddi du chien et du cobaye morphinés.
- L'injection de l'excitant bêta type : isoprénaline (5 µg/kg I.V) donne une hypotension identique mais de plus longue durée : 15 à 20 minutes.
- Les récepteurs bêta sont alors bloqués par injection I.V. de 2 mg/kg de propanolol.
- Ultérieurement, une nouvelle injection de 20 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone redonne une hypotension semblable à la première,
- alors que 5 µg/kg d'isoprénaline ne sont plus hypotenseurs.

Au total, à la dose spasmolytique oddienne, le corps n° 11 ne paraît pas doué d'effet excitant des récepteurs bêta-sympathiques.

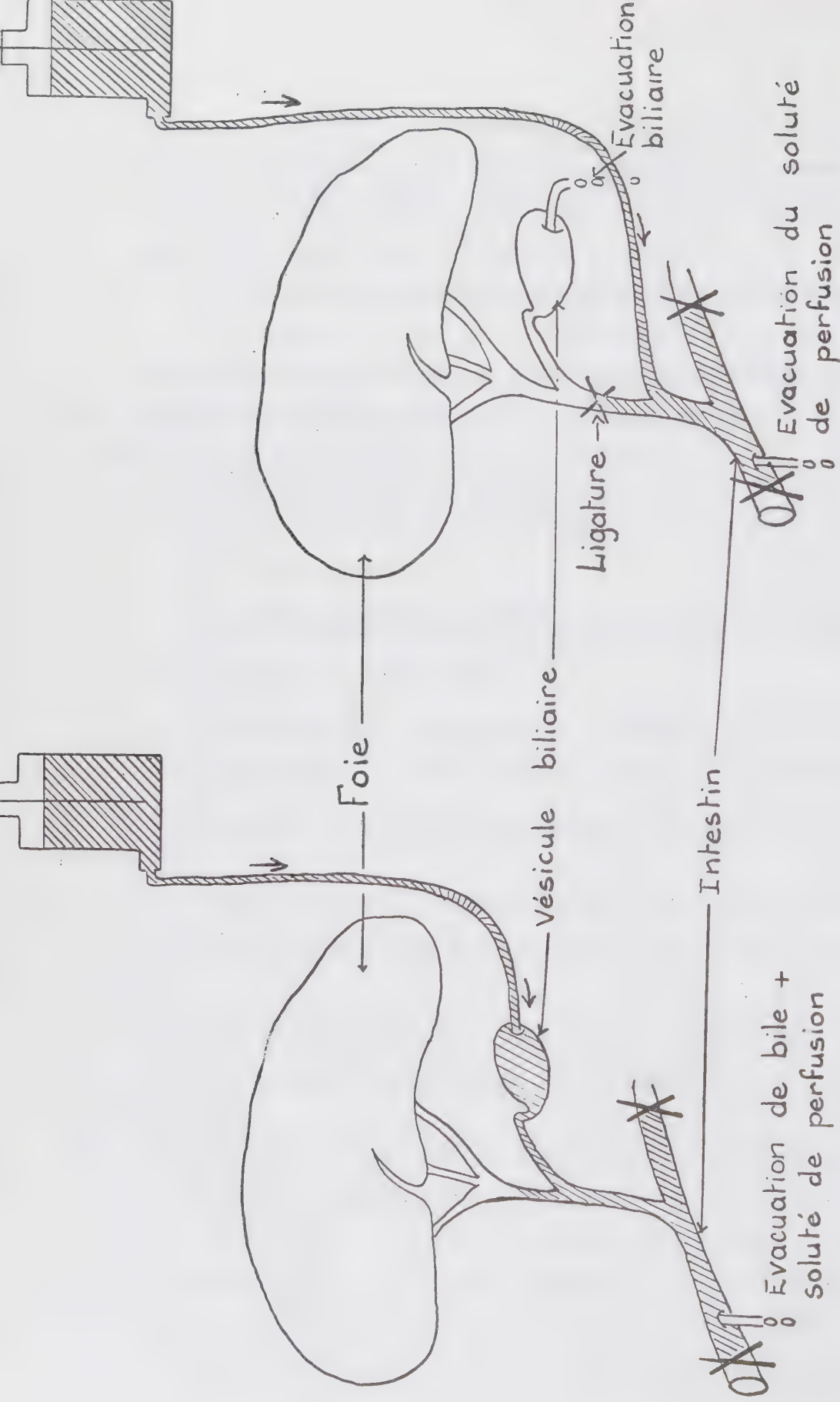
// E - L'hyperpression cholérétique permet-elle d'expliquer //

// l'ouverture du sphincter d'Oddi ? //

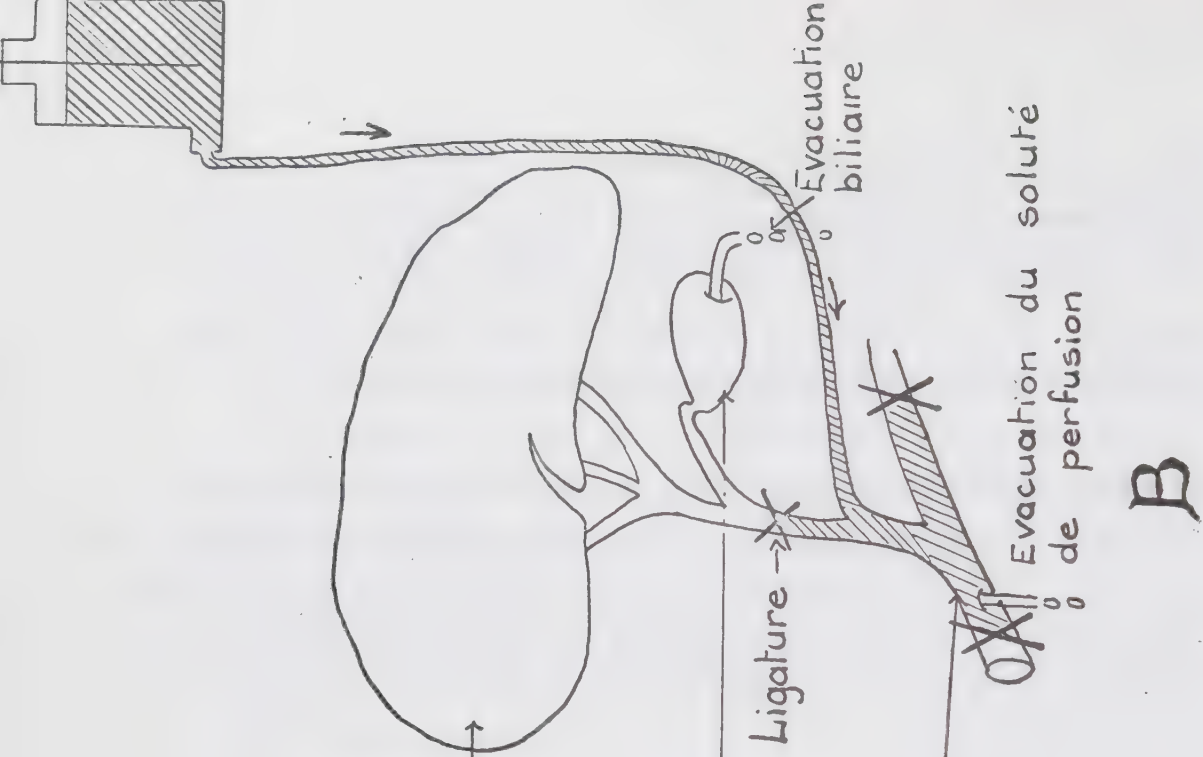
Il faut éliminer, en effet, l'incidence de l'hyperpression déclenchée par la cholérèse, puisque le corps n° 11 est à la fois spasmolytique et cholérétique, les deux effets se déclenchant à peu près au même moment sur le chien par exemple. L'hypercholérèse augmente la pression dans les canaux biliaires de 15 à 30 cm d'eau et pourrait favoriser ainsi l'ouverture de la barrière oddienne.

- Nous avons vérifié que le déhydrocholate de sodium, à la dose cholérétique de 50 mg/kg par voie intra-duodénale ne débloquent pas, chez le cobaye, le sphincter d'Oddi contracté par la morphine. Or, le déhydrocholate est connu pour déclencher une flèche d'hypercholérèse instantanée importante.
- De plus, chez le chien endormi au mébubarbital, dans des conditions expérimentales où l'effet spasmolytique du corps n° 11 peut intervenir sans effet de pression hypercholérétique, nous essayons de constater le déblocage du sphincter contracté par la morphine.

Voici, schématiquement, nos conditions expérimentales :



A



B

Etude chez le chien du rôle de l'hyperpression cholérique dans l'effet spasmolytique oddien de la méthyl-
4-ombelliférone

Le schéma A est celui utilisé jusque là. Le fond vésiculaire sert à l'admission du sérum physiologique perfusant le cholécyste en plus de la bile normalement excrétée (technique originale de BOISSIER et CHIVOT). Dans le schéma B proposé ici, le cholédoque est lié dans sa partie moyenne et le flot de bile s'évacue par le fond vésiculaire. Le tiers inférieur du cholédoque est canulé, le sphincter d'Oddi étant ainsi perfusé par du sérum physiologique fourni à la pression stable de 15 cm d'eau grâce à un vase de Mariotte.

Après une dose de 20 à 50 mg/kg du corps n° 11 injectée par voie intraveineuse à un groupe de sept chiens, la levée du blocage morphinique a lieu régulièrement.

Dans les conditions de l'essai schématisé en B, l'hyperpression déclenchée par le cholérétique n'intervient pas sur la région oddienne. L'hyperpression liée à l'effet cholérétique n'est pas en cause dans le déblocage du sphincter de l'animal morphiné.

// F - Peut-on invoquer essentiellement l'effet papavérinique //
// musculotrope ? //

Les drogues papavériniques sont beaucoup plus puissantes que les autres spasmolytiques dans la sphère oddienne. ROBELET l'a indiqué - 469 - (loc.cit.). De même CREMA (1966) - 484 -. Nos constatations antérieures sont en accord avec ces conclusions. Le corps n° 11 n'atteint que 10 % de l'effet de la papavérine dans les essais in vitro. Ce niveau d'activité ne semble pas justifier la mise en valeur de l'effet musculotrope pour expliquer l'effet oddien. Cependant, rappelons que la concentration biliaire du produit est très importante, de l'ordre de 10 µg par ml de bile

dans la première heure suivant le traitement, ce qui peut corriger le faible pouvoir intrinsèque de la drogue, et suggère un éventuel effet musculotrope local. L'électivité d'action trouverait ainsi un début d'explication. Nous n'avons pas vérifié parallèlement l'effet local de la papavérine - elle-même très active par voie générale - car cet alcaloïde subit, au niveau hépatique, une déméthoxylation qui le dénature [ZOCKLER - 473 - (loc.cit.)_].

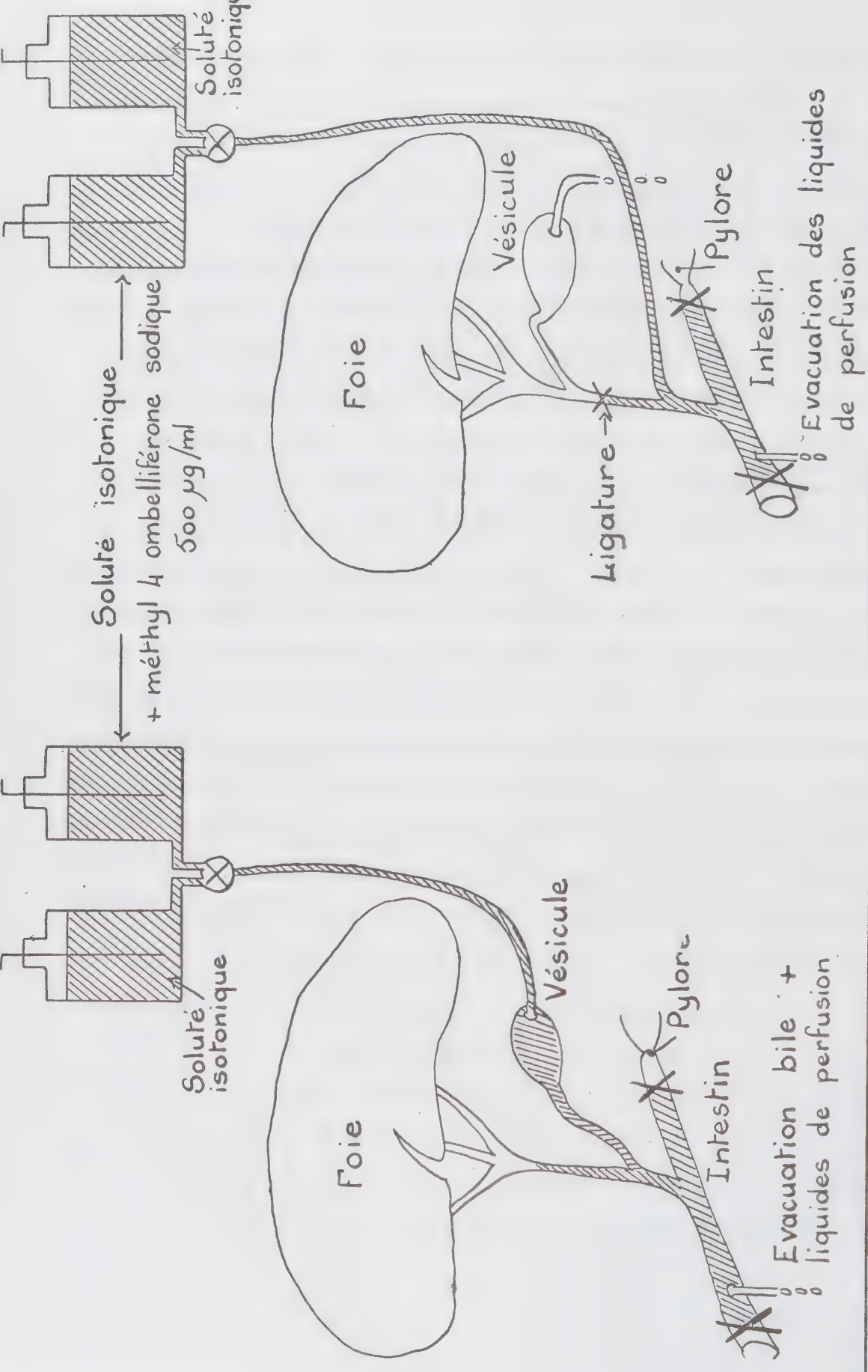
// G - Le produit peut-il agir in situ sur les fibres musculaires //
// du bas cholédoque et du sphincter d'Oddi ? //

a) Dispositions expérimentales :

Nous étudions ce point sur deux espèces : le cobaye et le chien.

Le cobaye subit les manipulations décrites lors des recherches sur l'activité du corps n° 11 sur le sphincter d'Oddi (technique de BOISSIER et CHIVOT). Le fond vésiculaire est perfusé avec du sérum physiologique (Cl Na 9 o/oo dans l'eau distillée), mais grâce à un robinet à deux voies, il est possible de passer à un autre flacon de Mariotte délivrant, sous même pression, du sérum physiologique contenant 500 µg/ml de sel sodé du corps n° 11. Nous avons retenu la concentration biliaire de la substance non glycuconjuguée trouvée dans la bile du chien, dans la première heure suivant traitement avec 50 mg/kg I.D. de méthyl 4 ombelliférone sodée. L'animal peut subir par ailleurs toute injection intraveineuse (préparation de la veine jugulaire).

Le chien est préparé suivant le montage schématisé en B, p. 357. En supplément, il existe aussi un double système de perfusion, deux vases de Mariotte délivrant dans le cathéter de perfusion du bas cholédoque, soit du sérum physiologique, soit du sérum physiologique contenant aussi 500 µg/ml de sel soluble du corps n° 11. Les deux schémas ci-dessous résument les particularités expérimentales. Il ne nous a pas été possible de transposer sur le cobaye le schéma de montage utilisé chez le chien, du fait de la trop courte distance séparant, chez le rongeur, l'abouchement du cystique à la région oddienne. Il faut redire encore les nombreuses difficultés expérimentales qui peuvent rendre douteux certains résultats et obligent à la multiplication des essais : choix de la bonne position des cathéters, obtention d'une respiration régulière des animaux anesthésiés, réponse variable (surtout chez le chien) au blocage morphinique et au déblocage oddien par le bromure de N butyl hyoscine ou le dihydroxydibutyléther. Le robinet permettant de changer le liquide de perfusion doit être loin de l'animal, pour éviter toute réaction du tractus digestif. Il en résulte un espace mort important. Il faut noter l'aspect rythmique de l'écoulement normal chez le chien, contrastant avec la régularité observée chez le cobaye.



MONTAGE SUR LE CHIEN

MONTAGE SUR LE COBAYE

Action directe de la méthyl 4 ombelliférone

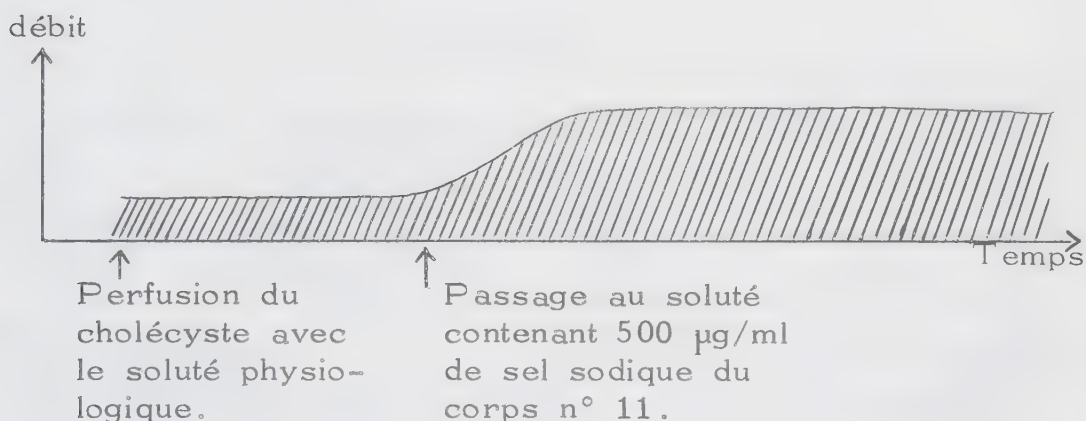
sur la région oddienne

b) Résultats :

Sur le cobaye :

(Huit montages interprétables).

- Sur deux montages présentant un débit spontanément très faible avec le liquide physiologique, le passage au soluté contenant le corps n° 11 s'accompagne d'une forte élévation de débit, à caractère définitif, selon le schéma suivant :



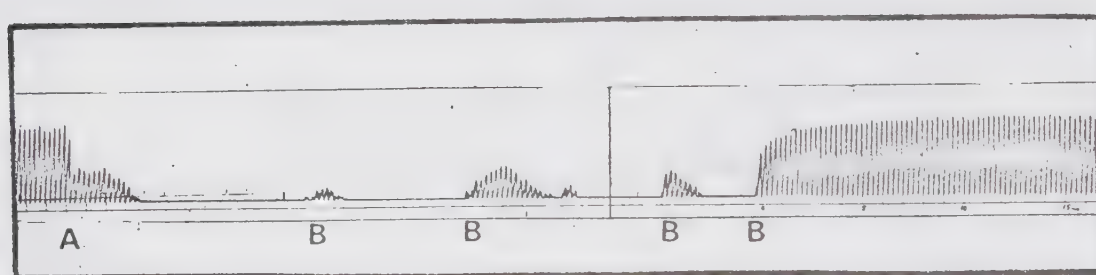
- Après injection I.V. de 1 mg/kg de morphine, le blocage oddien ne peut être levé par perfusion de liquide physiologique contenant le corps n° 11 qu'à condition qu'il y ait d'abord un déblocage spasmolytique de courte durée amenant la colonne liquide supplémentée au contact du cholécyste. Nous utilisons pour cela quelques substances ayant montré de telles qualités, comme le dihydroxydibutyléther donné à 300 mg/kg en I.V. La réponse à cette dernière substance employée seule montre que son effet ne dure que quelques minutes et est reproductible.

Le passage au liquide de perfusion contenant le corps n° 11, en même temps que l'injection veineuse de dihydroxydibutyléther, restaure un débit important et définitif.

Voici l'illustration d'une des réponses valables (Tracé n° 13).

Tracé n° 13

Débit de perfusion du cholécyste - Cobaye



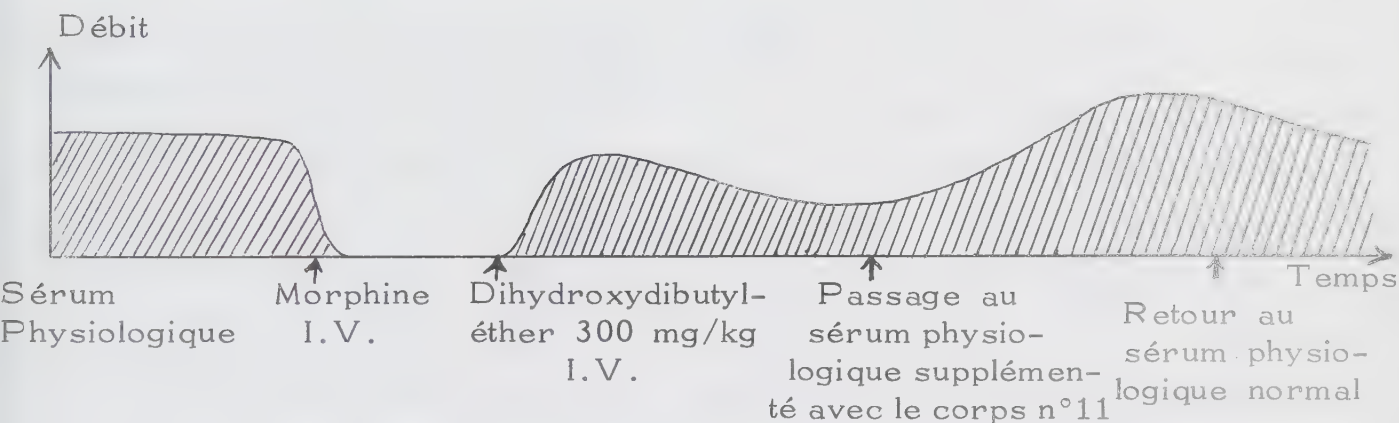
Perfusion avec
sérum physiologique seul

Perfusion avec
sérum physiologique +
500 µg/ml de corps n° 11

A : morphine 1 mg/kg I.V.

B : dihydroxydibutyléther 300 mg/kg I.V.

Le troisième schéma résume une expérience où, après blocage morphinique, le dihydroxydibutyléther à 300 mg/kg en I.V., restaure un débit qui s'atténue, sans arrêt total. Après une phase stationnaire, en passant au sérum physiologique supplémenté en corps n° 11, le débit est à nouveau très élevé. Après plusieurs minutes, le retour au sérum physiologique normal réduit à nouveau le débit.



Un certain nombre d'expériences (trois montages) est conduit en remplaçant le dihydroxydibutyléther par le bromure de N butyl hyoscine dont nous avons montré que, comme tous les atropiniques, il y a un pouvoir spasmolytique oddien faible. avec 30 mg/kg I.V. de la substance, nous retrouvons les résultats ci-dessus décrits.

En résumé, pour autant que la méthyl 4 ombelliférone est en contact avec la région oddienne, l'élévation du débit de perfusion est toujours vérifié chez le cobaye.

Sur le chien :

(Six montages interprétables).

- Les essais conduits sur les préparations à sphincter hyper-tonique donnent les mêmes résultats que sur le cobaye : il suffit d'un écoulement très faible pour déclencher un fort débit de perfusion quand le corps n° 11 arrive au contact des tuniques musculaires du bas cholédoque.
- Dans le cas du traitement avec la morphine par voie veineuse, il y a très souvent un écoulement résiduel de sérum physiologique qui, après passage au liquide de perfusion supplémenté en méthyl 4 ombelliférone conduit aussi à une reprise d'un écoulement important (deux montages). Dans tous ces cas, il faut plusieurs minutes pour obtenir le déclenchement du phénomène, temps nécessaire pour amener le corps actif dans la lumière du cholédoque terminal.
- Dans un cas aberrant où la morphine a élevé le débit de perfusion pendant quelques minutes avec un retour rapide à la normale, le passage alternatif deux fois de suite au sérum physiologique supplémenté avec la méthyl 4 ombelliférone a déclenché chaque fois une très forte élévation de débit.
- Il n'est pas possible d'utiliser des spasmolytiques "starter" comme chez le cobaye, les résultats étant beaucoup trop inconstants. Nous avons bien entendu utilisé, avec succès, deux fois le sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone en I.V. à cette fin. Mais l'essai n'a pas de valeur dans le cadre de nos préoccupations, le taux sanguin en dérivé actif ne permettant pas de conclure avec netteté sur l'effet "local" de la drogue.

Sur ces deux espèces, on voit qu'il faut un effet initial spasmodique assurant un premier écoulement. Ce dernier met en contact le corps n° 11 et la région oddienne : il s'installe alors un écoulement définitif pour autant que le corps n° 11 est présent dans la lumière cholédocienne.

c) Conclusion :

L'effet local oddien de la méthyl 4 ombelliférone, basé sur la présence d'une grande quantité du produit dans la bile, paraît certain, pour autant que dans les essais décrits ci-dessus où le produit n'est pas donné par voie générale, il n'y ait pas une absorption intestinale intempestive, suffisante pour qu'un taux circulant systémique prenne le relais. Rappelons que, dans le trajet de décharge du liquide de perfusion, il y a contact entre le produit et une petite partie du duodénum, ce qui pourrait fausser notre interprétation. Nous précisons ci-dessous ce point.

Nous définissons le taux sanguin plasmatique du produit, selon la technique de spectroscopie de fluorescence décrite plus haut, sur des cobayes : les uns recevant la dose minima toujours active par voie veineuse (10 mg/kg) et les autres une dose inférieure (5 mg/kg). Les protéines plasmatiques sont éliminées par chromatographie sur gel de Séphadex G 25 en tampon glycolle (pH 10,5). L'éluat est fractionné sur collecteur. Nous réunissons les fractions fluorescentes en lumière de Wood. Le produit est dosé par fluorescence à 370 mμ (gamme étalon de 0,01 μg/ml à 0,1 μg/ml de méthyl 4 ombelliférone sodée). La somme : fraction libre + fraction conjuguée est dosée de la façon suivante : le plasma est amené à pH 5,2 et mis en

contact avec du suc d'*Helix Pomatia* (I.B.F. 10.000 u/ml). Nous utilisons 1 ml de plasma pour 0,1 ml de suc diastasique. L'hydrolyse dure 24 heures à 37° C. L'hydrolysate est ensuite alcalinisé, puis purifié sur Séphadex G 25 comme précédemment. Afin de respecter nos conditions opératoires antérieures, nos animaux sont préparés selon la technique de BOISSIER et CHIVOT (perfusion des sphincters d'Oddi par le fond vésiculaire). Dans les cinq minutes suivant l'injection - temps toujours suffisant pour obtenir le déblocage morphinique - les taux plasmatiques de méthyl 4 ombelliférone sont résumés dans le tableau suivant (tableau 53).

Tableau 53

Taux plasmatique de méthyl 4 ombelliférone sur des cobayes recevant le produit par voie I.V. ou cholédocienne

	Après injection I.V de 10 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone	Après injection I.V de 5 mg/kg de méthyl 4 ombelliférone	Après perfusion du cholécyste avec 500 µg/ml de méthyl 4 ombelliférone
	3 cobayes	3 cobayes	4 cobayes
Taux plasmatique en produit libre en µg/ml	10	3	0,3
Taux plasmatique de la somme libre et conjugué en µg/ml	31	19	2,6

Dans les mêmes conditions expérimentales, la perfusion du cholédoque par un liquide physiologique contenant 500 µg/ml de méthyl 4 ombelliférone (5 fois le taux maximum de produit libre tel que nous l'avons dosé dans la bile du rat) conduit à un taux plasmatique très inférieur. Cette absorption "parasite" n'atteint pas le dixième du taux sanguin circulant efficace aussi bien en produit libre que conjugué, et ne peut fausser notre hypothèse sur un effet local du produit.

Nous pouvons aussi conclure que localement, la méthyl 4 ombelliférone elle-même est active. L'essai précédent est conduit avec le taux biliaire du produit libre chez le chien (500 µg/ml). Ce produit libre est toujours présent, même en faible quantité, dans la bile du rat, du chien et du cobaye, comme il est facile de le vérifier par passage du liquide en lumière de Wood. La masse principale du produit existe dans la bile sous forme de glycuconjugué (99 %). Ce dernier participe-t-il à l'action locale ? Nous n'avons pu compléter du soluté physiologique salé avec ce corps dans les expériences de perfusion du cholécyste. N'ayant pu disposer de ce composé à l'état pur, nous ne pouvons répondre à la question. Cependant, le type de réponse obtenue dans les perfusions du cholécyste avec du sérum salé isotonique supplémenté par un taux physiologique de méthyl 4 ombelliférone sodée est identique à celui observé dans les essais où le même produit est injecté par voie veineuse. On note une même rapidité de la réponse spasmolytique, une même intensité du débit retrouvé et une même durée d'action ; ce qui nous incite à penser que c'est la fraction libre dans la bile qui est responsable de l'activité spasmolytique oddienne.

// H - Peut-on invoquer aussi un effet de la substance par voie //
// systémique ? //

Nous reprenons les essais conduits sur le chien et décrits dans le paragraphe précédent. Après blocage morphinique, le produit est injecté par voie veineuse. La bile excrétée et contenant le corps est rejetée à l'extérieur par le fond vésiculaire et ne peut venir par voie cholédocienne, en contact avec la région oddienne. Cette dernière est perfusée avec du sérum physiologique.

Dans ces conditions, sur six montages, 20 à 50 mg/kg I.V. de sel sodique de la méthyl 4 ombelliférone conduisent toujours à un déblocage de la région oddienne du chien morphiné. L'effet spasmolytique est d'assez courte durée, toujours plus bref que dans les montages où la bile chargée de méthyl 4 ombelliférone peut se recycler par voie entéro-hépatique. Il existe donc un facteur systémique du produit, auquel s'ajoute certainement un facteur local, grâce au pouvoir de concentration du foie pour la méthyl 4 ombelliférone.

En conclusion, le mécanisme de l'activité spasmolytique oddienne de la méthyl 4 ombelliférone ne s'explique pas par un effet "antimorphine" stricto sensu, ni par une modification du tonus des systèmes nerveux réglant la vie végétative de cette région. L'hyperpression déclenchée par le pouvoir cholérétique de la drogue ne paraît pas en cause. Son effet papavérinique⁹ semble important, du fait de la grande concentration biliaire de la méthyl 4 ombelliférone et de son glycuconjugué : une activité spasmolytique locale intra-cholédocienne peut être invoquée. Cependant, il existe aussi un facteur systémique dans cette réponse élective : le produit injecté par

voie veineuse est très actif et participe certainement à l'ouverture initiale du sphincter, permettant le relais par l'action locale. Nous notons que dans l'étude des effets spasmolytiques intestinaux chez le chien, le produit a un effet puissant et très court de relachement du tonus des fibres lisses digestives (Tracé n° 1 - p. 305). Compte tenu des dispositions anatomiques du canal cholédoque chez le chien (trajet prolongé dans la tunique intestinale), on peut supposer que cet effet puissant et court permet le premier écoulement de bile chargée de méthyl 4 ombelliférone.

V - CONCLUSION DE NOS ETUDES SUR LA

METHYL 4 OMBELLIFERONE

La recherche d'activité cholérétique de drogues nouvelles nous a fait retenir, dans la série des coumarines, la méthyl 4 ombelliférone. Cette substance est déjà décrite dans la littérature. Mais aucune activité pharmacologique valable n'a pu être retenue jusque là, à son sujet.

- Nous confirmons l'activité cholérétique du produit, tant sur le chien que sur le rat. L'hypercholérèse, très importante, s'accompagne d'un gain des quantités excrétées des constituants biliaries. L'effet cholérétique est prolongé (1 h 30 à 2 h après traitement par voie duodénale). Le produit est un cholérétique vrai.
- Les recherches sur le pouvoir spasmolytique du produit dans divers domaines conduisent aux conclusions suivantes :
 - . Dans le domaine viscéral, le produit n'est pas atropinique ; c'est un papavérinique musculotrope faible dont l'effet se retrouve in vitro et in vivo sur plusieurs espèces (rat, chien et lapin).
 - . Dans le domaine vasculaire, le produit est un vasodilatateur papavérinique, actif tant dans le domaine coronaire que périphérique (sur le lapin et le chien).
 - . Au niveau du cholécyste, le produit n'est pas un contracturant, mais un relachant de la vésicule biliaire (essai in vitro et in vivo sur le cobaye et le chien) : ce n'est pas un cholagogue cholécystokinétique. Son domaine d'action privilégié semble être la région oddienne où il est régulièrement et puissamment spasmolytique, sur deux espèces (cobaye et chien), et vis-à-vis de plusieurs types de contractures : naturelles ou médicamenteuses (morphine - acétylcholine et carbacholine).

A ce niveau, le produit semble être le plus puissant connu, même vis-à-vis des spasmolytiques majeurs dont l'activité viscérale est bien établie (atropiniques). La méthyl 4 ombelliférone étant peu active dans le domaine intestinal, il nous paraît possible d'avancer le terme "d'électivité oddienne" de son action.

- L'étude du mécanisme d'action du produit, tant dans le domaine cholérétique que dans celui de la spasmolyse oddienne, nous conduit à envisager successivement les causes générales, humo-
rales, nerveuses, anatomiques et locales.

Dans le cas de l'effet cholérétique, nous retenons le tropisme hépatique du produit, capable de s'éliminer très rapidement dans la bile, sous forme libre et surtout glycuconjugée.

L'explication de l'effet spasmolytique requiert un facteur local en relation avec l'idée précédente : le faible pouvoir spasmolytique du produit est compensé par sa grande concentration biliaire immédiate, du fait de l'active épuration hépatique après administration. Il existe aussi un facteur systémique, le produit agissant par sa présence dans le sang circulant. Certaines relations structurales avec des substances d'activité voisine reconnue, font penser qu'il paraît possible d'étudier d'autres structures chimiques nouvelles dans ce domaine.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous nous sommes proposé, dans ce travail, de rechercher des anti-inflammatoires et cholérétiques nouveaux, en prenant comme base de structure chimique les coumarines et indane diones voisines des anticoagulants oraux utilisés en thérapeutique. En effet, des travaux préliminaires nous avaient montré l'existence de telles propriétés dans les antivitamines K utilisées chez l'homme. Notre problème était de dissocier ces deux effets nouveaux de l'activité hémorragipare, gênante dans un emploi thérapeutique éventuel.

Sur 136 substances étudiées, seules les aryl 2 indane diones 1,3 ont des activités anti-inflammatoires. Celles qui sont les plus actives sont la phényl 2 indane dione 1,3 et ses dérivés para halogénés. Ces mêmes molécules ont une forte activité anticoagulante qui motive leur emploi thérapeutique dans les thromboses. Il n'a pas été possible de trouver des corps ayant une activité purement anti-inflammatoire, ni les règles permettant de les prévoir dans cette série.

Nous avons trouvé, par contre, des corps ayant une activité purement cholérétique, principalement parmi les hydroxy coumarines et, dans ce cas, nous avons pu dégager les règles permettant de prévoir la dissociation des effets anticoagulant et hépatique. Nous avons fait choix d'une de ces coumarines, la méthyl 4 ombelliférone, et l'avons étudiée plus complètement. Le produit est un cholérétique vrai, non cholagogue, spasmolytique des voies biliaires et particulièrement oddienne. A ce dernier point de vue, il se classe comme le meilleur produit connu à ce jour dans le cadre des expériences poursuivies sur deux espèces animales : le cobaye et le chien.

Des arguments anatomiques, physiologiques et métaboliques nous ont permis d'avancer quelques hypothèses sur le mode d'action du corps dans les deux champs étudiés : l'hypercholérèse et l'activité spasmodique oddienne élective.

o

o

o

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS (SS), COBB (R) - 357 - A possible basis for the anti-inflammatory activity of salicylates and other non hormonal antirheumatic drugs.
Nature 1958 - 181 - 773.
- ADAMI (E), MARAZZI-UBERTI (E), TURBA (C) - 78 - Analgesic action of 4 hydroxy coumarins.
Arch. ital. Sci. Farmacol. 1959 - 9 - 115, 117.
- AEBI (A), GYURECH-VAGO (E), HOFSTETTER (E), WASER (P) - 84 - Alkylarte indane dione mit anticonvulsiver wirkung.
Pharm. Acta. Helvet. 1963 - 38 - 407, 417.
- ALBRITTON (EC) - 316 - Standards values in blood.
W.B. Saunders and C° Ed. - Philadelphia 1952.
- ALEXANDER (B), DEVRIES (A), GOLDSTEIN (R), LANDWEHR (G) - 254 - A prothrombin conversion accelerator in serum.
Sciences 1949 - 109 - 545.
- ALMQUIST (HJ) - 246 - Vitamin K.
Physiol. Rev. 1941 - 21 - 194, 216.
- AMBROSE (AM), DE EDS (F) - 219 - Effect of rutin on permeability of cutaneous capillaries.
J. Pharm. and Exp. Therap. 1947 - 90 - 359, 363.
- ANNEGERS (JH), SNAPP (FE), IYY (AC) - 434 - A study of the excretion of cinchophen in bile and urine and the posology of the drug.
Gastro Enterology 1943 - 1 - 597, 614.
- ANNONI (G) - 205 - Anticholesterinemic power of a substance with vitamin P action : the disulfate ester sodium salt of 4 methylesculétine.
Riv. Gerontol. Geriat. 1957 - 6 - 243, 251. in C.A. 1956 - 54 - 5790.
- ARORA (RB), MATHUR (CN) - 276 - Relationship between structure and anticoagulant activity of coumarin derivatives.
Brit. J. Pharm. 1963 - 20 - 219, 35.
- ARORA (RB), MATHUR (CN), SETH (SDS) - 179 - Anticoagulant and cardiovascular actions of calophyllolide and indigenous complex coumarin.
Arch. Int. Pharm. 1962 - 139 - 75, 84.

- ARORA (RB), SESHADRI (TR), KRISHNASWAMX (NR) - 101 -
Antiveratrinic activity of coumarin and its derivative compounds.
Arch. Int. Pharmacodyn. 1960 - 124 - 150, 157.
- ARTEMENKO (RH) - 168 - On the dependence between the chemical
structures and the pharmacological effect among the chromone deriva-
tives.
Pharmakol i Toxicol 1957 - 5 - 5954.
- AUCLAIR (M), HAMEAU (N) - 400 - Toxicité et pharmacologie de deux
solvants organiques : diméthylacétamide et diméthylsulfoxyde.
C.R.S.Biol. 1964 - 158 - 245.
- BALDONI (E), DE BERNARDI (A), FLAMENI (A), MILANI (C) - 467 -
Attività della N fenil 2 metilammino 3 (σ, σ difenil propilammino) N
Butilamina fosfato (154 DF) sulle vie biliari extra epatiche.
Arch. Ital. Sc. Farmacol. 1963 - 13 - 43, 45.
- BALDWIN (E) - 73 - Anthelmintic potency in relation to chemical constitution.
Brit. J. Pharmacol. 1948 - 3 - 91, 107.
- BARGETON (D) - 401 - Contribution à l'étude du rôle physiologique des
sels biliaries - Etude quantitative de l'action cholérétique des sels biliaries
C.R.S.Biol. 1946 - 140 - 338, 342.
- BARGETON (D), SALESSE (J), BARBER (J), DELAVIERRE (C)
- 393 - Activité physiologique et toxicité des dérivés cétoniques des
acides biliaries.
Arch. Int. Pharmacod. 1952 - 90 - 18, 32.
- BAXTER (RA), RAMAGE (CR), TIMSON (JA) - 198 - Furochromes
I - Synthesis of Khellin.
J. Chem. Soc. 1949 (suppl. issue n° 1) 530, 33.
- BEILER (JM), MARTIN (GJ) - 213 - Inhibitory action of vitamin P compound
on hyaluronidase.
J. Biol. Chem. 1947 - 171 - 507, 511.
- BENARD (H), GADJOS (A), TISSIER (A) - 448 - Hémoglobine et
pigments apparentés.
Masson 1949 p. 287.

- BENNETTS (HW), UNDERWOOD (EJ), SHIER (FL) - 126 -
Australian Vet. J. 1946 - 22 - 2. In SCINE (TO) - 19 -
- BENZI (G), CREMA (A) - 468 - Studio comparativo in vitro ed in vivo
della azione antispastica dei farmaci sul coledoco terminale.
Boll. Chim. Farm. 1966 - 105 - 536, 540.
- BERSCH (HW), DOPP (W) - 67 - Tuberkulostatische Wirkung einiger
aromatischer säuren und coumarin in vitro.
Arzeim. Forsch. 1955 - 5 - 116, 120.
- BEZANGER, BEAUQUESNE (L) - 372 - Action cholérétique de quelques
flavonoïdes.
C.R.S.Biol. 1964 - 158 - 2095, 2096.
- BICKOFF (EM), LYMAN (RL), LIVINGSTON (AL), BOOTH (AN) - 136 -
Isolation of a new estrogen from Ladino Clover.
J. Am. Chem. Soc. 1958 - 80 - 3069, 72.
- BIGGERS (JD) - 139 - Symposium on pharmacology of plant phenolics.
Acad. Press London 1958 - p. 69.
- BIGGERS (JD), CURNOW (DH) - 129 - Estrogenic activity of subterranean
Clover. I - Estrogenic activity of genistein - II - Isolation of genistein.
Biochem. J. 1954 - 58 - 278, 287.
- BINET (L), BURSTEIN (M) - 456 - Sur la motricité des vaisseaux péri-
phériques.
La Presse Médicale 1949 - 33 - 445, 46.
- BINGHAM (JB), MEYER (OO), POHLE (FS) - 241 - Studies on the
hemorrhagic agent 3,3-methylene bis (4 hydroxy coumarin). I - Its effect
on the prothrombin and coagulation time of the blood of dogs and humans.
Am. J. Med. Sci. 1941 - 202 - 563, 578.
- BIRCH (AJ) - 4 - Biosynthese des cumarins durch Bindung von azetyl-
gruppen.
Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 1957 - 14 - 186, 191.
- BIRNIE (JH), GRAYSON (J) - 422 - The effect of anaesthesia on tempera-
ture and liver blood flow in rats.
J. Physiol. London 1951 - 114 - 30.

BIZARD (G) - 384 - Sécrétion de bile par le foie du rat. Action de la merallévide.

J. Physiol. 1958 - 50 - 157.

BIZARD (G), PARIS (J) - 383 - Cholérèse et agents cholérétiques.

Rev. Int. Hépatol. 1957 - 7 - 437, 492.

BIZARD (G), PARIS (J) - 453 - Actions pharmacologiques sur les voies biliaires.

Actualités pharmacologiques 1961 - XIII - 1.

BIZARD (G), VANLERENBERGHE (J) - 382 - Cholérèse et cholérétiques

J. Physiologie 1956 - 48 - 207, 364.

BIZARD (G), VANLERENBERGHE (J), GUERRIN (F), GODCHAUX (R)

- 407 - Rôle de l'anhydrase carbonique dans la formation de la bile.

J. Physiol. (Paris) - 1958 - 50 - 155, 156.

BIZARD (G), VANLERENBERGHE (J), GUERRIN (F), ROBELET (A)

- 423 - Action des barbituriques sur la sécrétion biliaire (étude expérimentale).

J. de Phys. 1962 - 54 - n° 2 - 295, 296.

BLAKE (OR), ASHWIN (JG), JACQUES (LB) - 310 - An assay for the antithrombotic activity of anticoagulants.

J. Clin. Pathol. 1959 - 12 - 118, 122.

BLAKE (JM), WOOD (EG), O'MOORE (D), NELL (RG) - 184 - The vasodilating effects of coumarin derivatives.

Am. J. Med. Sci. 1962 - 243 - 598, 602.

BLANC (B) - 406 - Etude d'une nouvelle substance cholérétique, le sel sodique de l'acide alpha (1 hydroxy-cyclohexyl) butyrique).

Thèse Med. Lyon 1958.

BLANK (F), SUTER (R) - 65 - The bacteriostatic action of anthocyanin and related compounds.

Experientia 1948 - 4 - 72, 73.

BLAWSON (W) - 133 - Oestrogenic activity of some derivatives of isoflaven and isoflavanol.

J. Chem. Soc. 1954 - 4448, 4450.

- BLUMBERG (H), DAYTON (HB), GARDON (SM) - 98 - Bronchodilator action of the anticoagulant warfarin sodium.
Science 1957 - 127 - 188, 190.
- BOHM (K) - 8 - Die Flavonoïde - I - Arzm. Forsch. 1959 n° 9 - 539, 544.
- BOHM (K) - 9 - Die Flavonoïde - II - Arzm. Forsch. 1960 n° 9 - 647, 653.
- BOHM (K) - 10 - Die Flavonoïde - III - Arzm. Forsch. 1960 n° 9 - 778, 785.
- BOHM (K) - 11 - Die Flavonoïde - IV - Arzm. Forsch. 1960 n°10 - 54, 61.
- BOHM (K) - 12 - Die Flavonoïde - V - Arzm. Forsch. 1960 n° 10- 139, 142.
- BOHM (K) - 13 - Die Flavonoïde - VI - Arzm. Forsch. 1960 n°10 - 188, 193.
- BOHM (K) - 14 - Die Flavonoïde - VII- Arzm. Forsch. 1960 n°10 - 468, 472.
- BOHM (K) - 15 - Die Flavonoïde -VIII- Arzm. Forsch. 1960 n°10 - 547, 554.
- BOHM (K) - 16 - Die Flavonoïde - IX - Arzm. Forsch. 1960 n°11 - 381, 384.
- BOHM (K) - 17 - Die Flavonoïde - X - Arzm. Forsch. 1960 n°11 - 423, 425.
- BOHM (K) - 18 - Die Flavonoïde - XI - Arzm. Forsch. 1960 n°12 - 550, 555.
- BOISSIER (JR), CHIVOT (JJ) - 461 - Perfusion de la vésicule de cobaye à pression constante. Action de quelques contracturants et spasmolytiques.
J. de Physiol. 1959 - 51 - 408, 409.
- BOOTH (AN), MASRI (MS), ROBBINS (DJ), EMERSON (OH), JONES (FT), DE EDS (F) - 5 - Urinary metabolits of coumarins and o-coumarinic-acid.
J. Biol. Chem. 1959 - 234 - 946, 948.
- BORKOWSKI (B), SZPUNAR (K) - 171 - Die spasmolytische Wirkung einiger natürlicher Flavonoïde.
Pharm. Zentral Halle 1960 - 99 - 280, 284.
- BOSCHETTI (E), MOLHO (D), AKNIN (J), FONTAINE (L), GRAND (M) - 99 - Activité analeptique de quelques bases de Mannich d'hydroxy 7 coumarines et détermination de leur structure.
Chimie Thérapeutique - 1966 - n° 7 - 403, 407.

- BOSE (PK) - 7 - On some biochemical properties of natural coumarins.
J. Indian Chem. Soc. 1958 - 35 - 367, 375.
- BOUCARD (M) - 381 - La fistule biliaire chez le chien - Etude critique expérimentale.
Extrait Thèse Pharmacie Montpellier 1957.
- BOUCARD (M), ABELA (R) - 390 - La fistule biliaire chez le rat - Nouvelle technique d'étude de l'activité cholérétique.
Ann. Pharm. Franç. 1963 - 21 - 551, 559.
- BOUCARD (M), NEGRE (A) - 424 - Régulation thermique et débit biliaire.
Thérapie 1964 - 19 - 431, 439.
- BOUNDS (DG), POPE (GS) - 134 - Light absorption and chemical properties of mirestrol, the estrogenic substance of *Pueraria mirafica*.
J. Chem. Soc. 1960 - 3696, 3705.
- BRADBURY (RB), WHITE (DE) - 128 - Chemistry of subterranean clover I - Isolation of formononetin and genistein.
J. Chem. Soc. 1951 - 3447, 3449.
- BRADBURY (RB), WHITE (DE) - 130 - Chemistry of subterranean clover II - Synthesis and reduction of isoflavones related to genistein and formononetin
J. Chem. Soc. 1953 - 871, 876.
- BRADBURY (RB), WHITE (DE) - 131 - Vitamins and hormones.
Acad. Press. New York 1954 - vol. 22.
- BRADEL-GAY (Y) - 169 - Activités spasmolytiques et coronarodilatatrices de quelques dérivés de l'éthyl 3 chromone.
Thérapie 1962 - 17 - 1211, 1218.
- BROCADES (Sth) - 275 - Activité anticoagulante conservée dans des hydroxy 4 coumarines ayant en 3 un métatoluène.
B.S.M. 1965 - n° 1688.
- BRODERSEN (R), KJAER (A) - 39 - The antibacterial action and toxicity of some unsaturated lactones.
Acta Pharmacol. 1946 - 2 - 109, 120.

- BRODIE (BB), WEINER (M), BURNS (JJ) - 371 - Conf. Intern. sur les thromboses et embolies - Bâle 1954 - Karger 1954.
- BRUNAUD (M), BRUNAUD (S) - 374 - Recherche sur les propriétés de la triméthoxy 4-2'-4' chalcone. II - Pharmacodynamie. Thérapie 1958 - 23 - 676, 688.
- BRUNEAU et Coll. - 200 - Activité vasodilatatrice coronaire de l'éthyl 2 carbethoxy 3 chromone.
Brevet belge 1961 - n° 604.097.
- BURN (JH) - 349 - Practical Pharmacology.
Edit. Blackwell Scientific Publications - Oxford 1952.
- BUSTINZA (F), LOPEZ (AC) - 64 - Obtencion de rutina y quercina y contribucion al estudio de sus propiedades antibacterianas.
Jardin botanico de Madrid 1946 - 7 - 549, 559.
- BUTT (HR), ALLEN (EV), BOLLMAN (JL) - 243 - A preparation of spoiled sweet clover $\angle$ -3-3' methylene bis (4 hydroxy coumarin)-7 which prolongs coagulation and prothrombin time of the blood : preliminary report of experimental and clinical studies.
Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 1941 - 16 - 388, 395.
- BUTTINI (A), CARMINATI (G), GALIMBERTI (P), GEROSA (V), MELANDRI (M) - 415 - Su alcuni nuovi derivati α isobutirrici.
Boll. Chim. Farm. 1962 - 101 - 354.
- BUU HOI (NP) - 414 - Activité cholérétique de quelques dérivés de l'acide α naphtylacétique.
Med. Expt. 1961 - 4 - 393, 396.
- BUU-HOI (NP), ECERT (B) - 143 - Hydroxylated 3 aryl and 3-4 diaryl coumarins.
J. Org. Chem. 1954 - 19 - 1392, 1395.
- CAHEN (R), BOUCHERLE (A) - 398 - Etude pharmacologique de la trihydroxy 2-4-6 propiophénone.
C.R.S. Biol. 1963 - 157 - 112, 116.

- CAILLARD (B), DEVANT (J), KLEPPING (J) - 320 - Etude comparative de la coagulabilité sanguine chez l'homme et quelques espèces animales. C.R.S.Biol. 1960 - 156 - 1813, 1817.
- CALL (TG) - 164 - Spasmolytics from plants. I - Suksdorfin A and columbianin. Proc. Montana Acad. Sci. 1956 - 16 - 49, 50.
- CALL (TG), FISCHER (EB) - 163 - Some pharmacological effects of the roots of *pteryxia terebinthina*, var-*terebinthina* and of p-teryxin, a substance isolated from the roots. Northwest Sci. 1958 - 32 - 96, 100.
- CAMPBELL (HA), LINK (KP) - 242 - The hemorrhagic sweet clover disease. IV - The isolation and crystallisation of the hemorrhagic agent. J. Biol. Chem. 1941 - 138 - 21, 33.
- CANELLAS (J) et Coll. - 464 - Action sur le sphincter d'Oddi du cobaye d'un analgésique, d'un neuroleptique et de leur association. C.R.S. Biol. 1965 - 159 - 1538.
- CAPORALE (G) - 111 - L'acido bergapten 8 carbonico. E sue proprietà fotodinamiche. Farmaco Pavia Ed. Sc. 1958 - 13 - 784.
- CARLSON (RM), SEAGER (LD) - 355 - The acute toxic effects of dicoumarol. Fed. Proc. 1948 - 7 - 210.
- CAROLI (J), PLESSIER (J), PLESSIER (B) - 470 - Le contrôle hormonal de l'excrétion de la bile dans le duodénum. Ann. de Biol. Clin. 1962 - 19^e année - n° 10-12 - 831, 842.
- CASADIO (S), PALA (G), BRUZZESG (T), MARAZZI-UBERTI (E) - 416 - Acidi naftilacetici. Il Farmaco Ed. Sc. 1962 - 17 - 797, 817.
- CASCIO (G) - 154 - Caratterizzazione dell'effetto diuretico esercitato dall'aldeide cumarin 3 glicosilica. Arch. It. Sc. Farmacol. 1964 - 13 - 165, 167.
- CASCIO (G), PALAZZO ADRIANO (M) - 155 - Azioni farmacologiche di due aldeidi glicosiliche etero cicliche a spiccata attività diuretica. Il Farmaco Ed. Sc. 1964 - 19 - 171, 184.

- CAUJOLLE (F) - 420 - Activité du 3 éthoxy 4 benzaldéhyde sur la sécrétion biliaire - Structure chimique - activité cholérétique des dérivés de la vanilline.
Arch. Int. Pharm. 1965 - 152 - 360, 365.
- CAVALLINI (G), MIELLA (E), GIUMELLI (A) - 309 - Influenza dei sostituenti nucleofili e elettrofili sull'azione anticoagulante di alcuni derivati del 2 fenil 1,3 indane dione.
Il Farmaco Ed. Sc. 1955 - 10 - 710, 713.
- CAVALLITO (CJ) - 45 - Medicinal Chemistry.
Vol. Suter N.Y. Editor 1951.
- CHABROL (E), CHARONNAT (R) - 392 - Recherches expérimentales sur l'action cholérétique du chloral et de ses dérivés.
C.R.S. Biol. 1930 - 105 - 439, 441.
- CHABROL (E), CHARONNAT (R) - 421 - L'action cholérétique de dérivés chlorés de l'acide acétique.
C.R.S. Biol. 1931 - 106 - 17, 18.
- CHABROL (E), CHARONNAT (R) - 426 - Le problème de la cholérèse, ses difficultés cliniques et expérimentales.
J. Thérap. de Paris 1955 - p. 295, (Douin Ed.).
- CHABROL (E), CHARONNAT (R) - 474 - Variation de la sécrétion biliaire sous l'influence des alcaloïdes modificateurs du système nerveux végétatif.
C.R.S. Biol. 1929 - 100 - 751, 752.
- CHABROL (E), CHARONNAT (R), MAXIMIN (M), PORIN (J), BOQUETIN (A) - 368 - Recherches expérimentales sur l'action cholérétique du Neptal.
C.R.S. Biol. 1925 - 102 - 991, 992.
- CHABROL (E), CHARONNAT (R), MAXIMIN (M), WAITZ (R) - 429 - Action cholérétique des dérivés du gaïacol.
C.R.S. Biol. 1931 - 107 - 1240, 1243.
- CHABROL (E), CHARONNAT (R), MAXIMIN (M), WAITZ (R) - 430 - Recherches expérimentales sur l'action cholérétique des phénols.
C.R.S. Biol. 1930 - 104 - 43, 45.

CHAKRABORTY (DP), DASGUPTA (A), BOSE (PK) - 69 - On the antifungal action of some natural coumarins.
Annals of bioch. and axptl. Med. 1957 - 17 - 59, 62.

CHAKRABORTY (DP), MIRA (S), BOSE (PK) - 48 - On the antibiotic properties of some natural coumarins.
Trans bosc. Res. Inst. 1961 - 24 - 31, 34.

CHANG (MC), PINCUS (G) - 123 - Does phosphorylated hesperidin affect fertility ?
Science 1953 - 117 - 274.

CHARLIER (R) - 370 - Action de la p-hydroxy phényl salicylamide sur la sécrétion de la bile.
Arch. Int. Pharm. 1953 - 14 - 103, 110.

CHARLIER (R), HOSSLET (A), CANIVET (L) - 224 - Mesure de la perméabilité capillaire chez le rat. Technique et applications pharmacologiques.
Arch. Int. Physiol. et Bioch. 1963 - 71 - 51, 63.

CHEMNITIUS (KH), HOFMANN (H) - 77 - Zur analgetischen Wirkung von 1-4 Naphtoquinone.
Z. inn. Med. 1957 - 1 - 25, 28.

CHENDEROVITCH (J) - 431 - Les conceptions actuelles des mécanismes de la sécrétion biliaire.
La Presse Médicale 1963 - 71 - 2645.

CHENG (EWK), VODER (L), STORY (CD), BURROUGHS (W) - 133 - Estrogenic activity of some naturally occurring isoflavones.
Ann. N.Y. Ac. Sc. 1955 - 61 - 652, 659.

CHEVILLARD (L) - 347 - Arthrites expérimentales.
Rev. Rhum. 1952 - 1051, 1052.

CHEYMOL (J), BOISSIER (JR), LECHAT (P) - 327 - Principes de l'étude de la toxicité d'un médicament nouveau.
Thérapie 1961 - 16 - 326, 340.

CHIHARA (G) - 394 - Clinical application of infrared spectroscopy.
Bunko Kenkyu 1961 - 2 - 181, 196.

- CHIRAY (Ch), DEBRAY (Ch), BESANCON (JL) - 459 - Description de la méthode de la vésicule isolée du cobaye.
Revue du foie 1943 - 2 - 5, 7.
- CHRISTENSEN (F) - 161 - Uricosuric effect of dicoumarol.
Acta Med. Scandinavica 1964 - 175 - 461, 468.
- CLARK (WG) - 229 - Effect of rutin on dicoumarolism.
P.S.E.B.M. 1948 - 69 - 97, 98.
- CLARK (WG), GEISSMAN (TA) - 220 - Potentialisation of effects of epinephrine by flavonoid (Vitamin P-like) compounds, relation of structure to activity.
J. of Pharm. and Exp. Therap. 1949 - 95 - 363, 381.
- CLARK (WG), MAC KAY (EM), JORDAN (ML) - 175 - Effect of flavonoid (vitamin P-like) substance on histamin toxicity, anaphylactic shock, histamin enhanced capillary permeability to dye and bleeding time.
J. Allergy 1950 - 21 - 133, 147.
- CLARK (WG), UNCAPHER (RP), JORDAN (ML) - 142 - Effect of flavonoids (vit. P) on mortality from total body - Röntgen irradiation.
Science 1948 - 108 - 629, 630.
- CLEMENT - 388 - Influence du degré de désaturation du substrat sur la vitesse d'hydrolyse in vitro par le suc pancréatique. Etude du degré de désaturation des acides gras libérés.
B.S.C.B. 1954 - 36 - 1319.
- COHEN (Y), GOT (P) - 338 - Influence de la température ambiante sur l'inflammation de la patte du rat et sur l'effet anti-inflammatoire de la phénylbutazone.
C.R.S.Biol. 1961 - 253 - 2421.
- COHEN (H), GRAFF (M), KLEINBERG (N) - 329 - Inhibition of dextran edema by proteolytic enzymes.
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 1955 - 88 - 517, 519.
- COLWELL - 387 - Lipide content and volume of bile secreted by choline deficient rats with fatty livers.
Am. J. Physiol. 1951 - 164 - 274, 283.

- CORRELL (JT), COLEMAN (LL), LONG (S), WILLY (RF) - 262 -
Diphenylacetyl 1,3 indane dione as a potent hypoprothrombinemic agent.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1952 - 80 - 139, 143.
- COSCO - MONTALDO - 476 - Action de la dynamique duodénale sur
l'automatisme du sphincter d'Oddi.
J. Chirurgie (Paris) 1964 - 87 - 447, 460.
- COURVOISIER (S), DUCROT (R), FOURNEL (J), JULOU (L) - 330 -
Propriétés pharmacologiques générales de la chloro 3 $\frac{1}{2}$ (méthyl 4
pipérazinyl 1) 3'-2' propyl 1' $\frac{1}{2}$ 10 phénothiazine 6710 RP.
C.R.S.Biol. 1958 - 152 - 1371 - 1374.
- CREMA (A) - 451 - Farmacologia della via biliare extra epatica.
Arch. Ital. Sci. Farmacol. 1965 - 15 - 6, 27.
- CREMA (A) - 466 - Action of sympathomimetic agents on the choledocho
duodenal junction in vitro.
Arch. Int. Pharmacodyn. 1963 - 146 - 586, 589.
- CREMA (A) - 484 - Action of some spasmolytic agents on the isolated
bile duct.
Arch. Int. Pharmacodyn. 1966 - 161 - 116, 123.
- CREMA (A), BENZI (G) - 465 - Relievi farmacologici sullo sfintere isolato
di Oddi.
Arch. Int. Pharm. 1960 - 129 - 264, 267.
- CREMA (A), BENZI (G), FRIGO (GM), BERTE (F) - 480 - Reponse
of the terminal bile duct to morphine and morphine like drugs.
J. Pharm. Exptl. Therap. 1965 - 149 - 373, 378.
- CREMA (A), BENZI (G), FRIGO (GH), BERTE (F) - 483 - Occurrence
of α and β receptors in the bile duct.
P.S.E.B.M. 1965 - 120 - 158, 160.
- CREMA (A), BERTE (F) - 482 - Action of sympathomimetic drugs on the
isolated junction of the bile duct and duodenum.
Brit. J. Pharmacol. 1963 - 20 - 221, 229.
- CURNOW (DH), ROBINSON (TJ), UNDERWOOD (EJ) - 127 - Estrogenic
action of extracts of subterranean clover.
Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 1948 - 26 - 171, 180.

- CUTTING (WC), DREISBACH (RH), AZIMA (M), NEFF (BJ) - 70 -
Antiviral chemotherapy.
Stanford Med. Bull. 1949 - 9 - 236, 238.
- DADAK (V), HODAK (K) - 52 - Some relations between the structure
and the antibacterial activity of natural coumarins.
Experientia 1966 - 22 - 38, 39.
- DAM (H) - 247 - Vitamin K - Its chemistry and physiology.
Advances in enzymology - 1942 - 2 - 285, 324.
- DAM (H), GEILL (T), LUND (E), SONDERGAARD (E) - 308 -
Laboratory and clinical experiments with various anticoagulants.
Conférence internationale sur les thromboses et embolies - Bâle 1954.
Benno Schwabe edit. p. 212, 215.
- DAM (H), SCHONHEYDER (F) - 244 - The occurrence and chemical
nature of vitamin K.
Biochem. J. 1936 - 30 - 897, 901.
- DA RE (P) - 199 - Ricerca di coronarodilatatori nel gruppo del cromone.
Il Farmaco 1958 - 13 - 561, 573.
- DA RE (P), RECORDATI - 173 -
B.S.M 1964 n° 4092.
- DA RE (P), VERLICI (L), SETNIKAR (I) - 172 - Recherches sur les
spasmodiques 6-aminométhyl chromones et flavones.
Boll. Chim. Farm. 1960 - 99 - 1, 4.
- DA RE (P), VERLICI (L), SETNIKAR (I), MURMANN (W) - 93 -
N substituted 7 methoxy 8 amino methyl chromones and flavones :
New L.D. system stimulants.
Nature 1959 - 184 - 362, 363.
- DAUER (M), CRON (JM) - 141 - Failure of rutin and related flavonoids to
influence mortality following acute whole body X radiation.
Proc. Soc. exp. biol. med. 1952 - 79 - 702, 707.
- DEBRAY (Ch) - 452 - Le test cholérèse - morphine.
Gastroenterologia 1962 - 97 - 137, 148.

- DEBRAY (Ch), HARDOUIN (JP), FABLET (J) - 452 - Effet protecteur du *Tiliae silvestris alburnum* sur les manifestations douloureuses provoquées chez les biliaries par l'action couplée du déhydrocholate de sodium et de la morphine.
Thérapie 1960 - 15 - 1040, 1041.
- DEBRAY (Ch), VAILLE (Ch), DE LA TOUR (Ch), ROZE (C) SOU-
CHARD (M) - 417 - Contribution à l'étude de la sécrétion biliaire et pancréatique externe chez le rat.
J. de Physiologie Paris 1962 - 54 - 459, 499.
- DE LACERDA (PMG) - 38 - Propriedades antibacterianas do dicumarol.
Rev. Fac. Med. Vet. Univ. Sao Paulo 1945 - 3 - 155, 156.
- DELAS (R), ROUX (G), ECALLE (R) - 396 - Influence de l'anesthésie sur la cholérèse expérimentale.
C.R.S. Biol. 1957 - 151 - 1429, 1431.
- DEL CAMPO (A), FAZZI (PL) - 59 - Sull'attività antibatterica di alcuni derivati 3 ammino cumarinici.
Rev. Ist. suro. terap. ital. 1958 - 33 - 389, 398.
- DELTOUR (G), BINON (F), HENAU (F), CHARLIER (R) - 201 - Recherche dans la série des benzofuranes, 1-benzofuranes possédant une activité vasodilatatrice.
Arch. Int. Pharm. 1961 - 131 - 84.
- DE NICOLA (P), CAPPELLETTI (G), SARTORI (S) - 301 - Studio comparativo dei reperti trombelastografici ed emocoagulative nell'uomo e in varie specie animali.
Haematologica 1957 - 42 - 179, 216.
- DIDISHEIM (P), HATTORI (K), LEWIS (JM), PITTSBURG (PA) - 319 - Hematologic and coagulation studies in various animal species.
J. Lab. clin. med. 1959 - 53 - 866, 875.
- DI MAGGIO (G) - 202 - Azione della quercetina sull'andamento di alcuni processi patologici sperimentali correlati alla malattia arteriosclerotica.
Archivio italiano di scienze farmacologiche 1957 - 7 - 1, 11.
- DODDS (EC), GOLDBERG (L), LAWSON (W), ROBINSON (R) - 137 - Synthetic oestrogenic compounds related to stilbene and diphenylethane.
Proc. Roy. Soc. London 1939 - B 127 - 140, 167.

- DOMENJOZ (R) - 332 - Sur le mécanisme d'action des substances anti-inflammatoires.
Actualités Pharmacol. 1954 - 7 - 73.
- DOMENJOZ (R) - 336 - The pharmacology of phenylbutazone analogues.
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1960 - 86 - 263, 267.
- DUCHENE-MARULLAZ (P), VACHER (J) - 334 - Le salicylamide :
action anti-inflammatoire.
Thérapie 1962 - 17 - 433, 437.
- DUQUENOIS (P), GREIB (E) - 46 - Les principes anti-bactériens de
la piloselle.
Ann. Ph. Fr. 1956 - 14 - 685, 690.
- DUX (A), THURN (P) - 478 - Mécanisme de vidange de la vésicule biliaire.
Fort. a.d. Geb. d. Röntgent. 1960 - 92 - 630, 644.
- EJIMA (A) - 50 - Mode of antibacterial activity of 3 acetyl 4 hydroxy coumarin
dehydroacetic acid.
J. Pharm. Soc. Jap. 1962 - 82 - 1631, 1634.
- EKMAN (B) - 297 - Effect of rutin on the rat paw's oedema.
Acta pharmacol. toxicol. 1947 - 3 - 261, 265.
- EMERSON (CH), BICKOFF (EM) - 138 - Synthesis of coumestrol 3,9
dihydro OH benzofuran (3,2 C) (1) benzopyran 6 one.
J. Am. Chem. Soc. 1958 - 80 - 4381, 4383.
- ENGELHORN (R) - 410 - Die choleretische Wirkung von 1-phenyl-1-hydroxy
n. pentan.
Arzneim. Forsch. 1960 - 10 - 255, 260.
- EWERBECK (E), LEGERSKI (R) - 176 - Experimenteller Beitrag zur
Frage : Verhütet Vitamin P den Transfusion szwischenfall.
Mschr. Kinderhk 1955 - 103 - 21, 23.
- EYSERIC (G), BECAUD (P), LEBRE (V) - 360 - Tests inflammatoires
et tests de coagulabilité dans le diagnostic et l'évolution des thromboses.
Ann. de biol. clin. 1962 - 20e année - Janv. Fév. p. 1, 5.
- FAHMY (IR), ABU-SHADY (H) - 104 - Isolation of ammoïdin from Ammi
majus.
Quat. J. Pharm. Pharmacol. 1947 - 20 - 281, 291.

- FAHMY (IR), ABU-SHADY (H), SCHONBERG (A) - 105 - A cristalline principle from Ammi majus.
Nature 1947 - 160 - 468, 469.
- FERLUX - 292 - Médicament pour le traitement des maladies à processus inflammatoire.
B.S.M. 1966 n° 5443.
- FINNEY (RSH), SOMERS (GF) - 333 - The anti-inflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives.
J. Pharm. and Pharmacology 1958 - 10 - 613, 620.
- FLORIO (R), COTTEREAU (Ph), MARIE (Cl), MARIE (F) - 318 - Sur le temps de Quick normal de quelques animaux domestiques.
Bull. Soc. des Sc. Vét. et Med. Comparées de Lyon 1959 - 3 - 129, 137.
- FONTAINE (L), GRAND (M), FOLZER (S) - 458 - Enregistrement kymographique des variations du débit sanguin coronaire et périphérique par le rotamètre de Shippley-Wilson.
Thérapie 1963 - 18 - 1213, 1220.
- FONTAINE (L), ODIEVRE (M), CACHET (Y), DREVON (B) - 82 - Pharmacologie de la phényl indane dione.
Thérapie 1961 - 16 - 34, 50.
- FORMANEK (K), HOLLER (H), JANISCH (H) - 170 - Beziehung zwischen Struktur und spasmolytischer Wirkung der Flavonoide.
Pharm. acta Helvetiae 1959 - 34 - 241, 243.
- FORST (BM), VALLIANT (ME), MAC CLELLAND (L), SOLOTOROV-SKY (M), CYCKLEL (AC) - 53 - Découverte de la novobiocine isolée de streptomyces niveus.
Antibiotics annual 1955 - 918, 923.
- FORSTER (W), OETTEL (H) - 405 - Ueber die choleretische Wirkung hydro aromatischer Carbonsäuren.
Arch. Exp. Path. Pharmacol. 1954 - 222 - 244, 247.
- FOWLKS (WL) - 115 - The chemistry of the psoralens.
J. invest. dermatol. 1959 - 32 - 249, 254.
- FRENCH (FA), FREEDLANDER (BL) - 439 - Derivatives of benzoic acid and simple phenols in the chemotherapy of tuberculosis.
J.A.P.A. 1949 - 38 - 343, 346.

- FRIEDMAN (M), BYERS (SO), MICHAELIS (F) - 386 - Production and excretion of cholesterol in mammals. II - Excretion of bile in the rat.
Am. J. of Physiology 1950 - 162 - 575, 578.
- FRILEUX (C), SAKKA (M) - 207 - Anticoagulants et syndrome biologique de l'athérome.
Sem. des Hop. Thérap. 1959 - Nov. - 828, 833.
- GABEL (JO) - 42 - The chemistry of antibiotic substances.
Uspekki Klim. 1948 - 17 - 565, 567.
- GABRIEL - 268 -
Berichte 1893 - 26 - 933.
- GARCET (S) - 343 - Méthode simple de mesure de l'activité anti-inflammatoire.
Thérapie 1961 - 13 - 549, 552.
- GAULTIER (M) - NOGRETTE (P) - 210 - Athérome et anticoagulants.
Sem. des Hop. Thérap. 1959 - Nov. - 834, 842.
- GAUTRELET (J) - 455 - Elements de technique physiologique.
Masson et Cie 1932.
- GAZAVE (JM) - 215 bis - Contribution à l'étude du deuxième facteur antiscorbutique.
J. de Physiol. 1966 - 58 - suppl. n° 1 - Janv. Fév.
- GAZET du CHATELIER (G), DUQUENOIS (P), GREIB (E) - 233 - Propriétés pharmacodynamiques de la méthyl 4 hydroxy 7 coumarine.
Ann. Pharm. Franç. 1955 - 13 - 697, 705.
- GEORGES (A), PAGE (J), DUVERNAY (G) - 418 - Propriétés cholérétiques du AC 3810 - Etude statistique sur le rat.
Thérapie 1963 - 18 - 907, 913.
- GERBET - 389 - Techniques d'étude de la cholérèse sur le rat. Recherche sur l'activité cholérétique des moyens de contraste pour cholécystographie.
Thèse Médecine - Paris 1958.

- GERMANE (S) - 81 - Analgesic activity of derivatives of 2 amino 2 phenyl 1,3 indane dione.
C.A. 1961 - 55 - 15.723 g.
Latjivar P S R Zinātum Akad. Vestis.
- GERMANE (S) - 83 - The anticonvulsant activity of derivatives of 2 amino 2 phenyl 1,3 indane dione 1,3.
C.A. 1961 - 55 - 15.723 f.
Latjivar P S R Zinātum Akad. Vestis.
- GERMANE (S) - 85 - Pharmacology of derivatives of 2 amino 2 phenyl 1,3 indane dione.
Latjivar P S R Zinātum Akad. Vestis 1961 n° 1 - 121, 129.
- GILBERT (WC), WALEFSKI (LA) - 161 - Cardiovascular changes observed following the experimental administration of anticoagulants.
J. Lab. Clin. Med. 1949 - 34 - 797, 799.
- GILFOIL (TM), KLAIVINS (I), GRUMBACH (L) - 345 - Effects of acetylsalicylic acid on the edema and hyperesthesia of the experimentally inflamed rat's paw.
The J. of Pharm. and Exp. Therap. 1963 - 142 - 1, 5.
- GIROUX (J), BOUCARD (M) - 385 - Télé enregistrement de la sécrétion biliaire chez le chien en fistule permanente.
Thérapie 1964 - 19 - 1503, 1508.
- GIROUX (J), BOUCARD (M), BEAULATON (JS) - 391 - Choix de l'espèce animale pour l'étude du débit biliaire en fistule temporaire.
Trav. Soc. Pharm. Montpellier 1956 - 16 - 24, 35.
- GIROUX (J), GRANGER (J), BEAULATON (LS), LANET (J) - 377 - Recherche pharmacodynamique sur l'acide N (α éthyl butyryl) amino 2 méthoxy 4' cinnamique.
Thérapie 1959 - 16 - 31, 41.
- GLEYS (P) - DELOR (J) - 226 - Action antivitaminique P de la P.I.D.
B.S. Chim. Biol. 1948 - 30 - 891, 896.
- GOMES (FP) - 192 - Activité antispasmodique du visnagan, un principe actif de l'Amni visnaga.
C.R.S. Biol. 1953 - 147 - 1836, 1839.

- GORI (E), MOLTENI (L) - 307 - Hypoprothrombinemic activity of new coumarin and indane dione compounds.
Conf. Int. sur thromboses et embolies - Bâle 1954 - B - Schwabe
Edit. p. 223, 227.
- GOTH (A) - 37 - The antibacterial properties of dicoumarol.
Science 1945 - 13 - 383.
- GRANGER (R), GIROUX (J) - 376 - Nouveaux dérivés de l'acide cinnamique agissant sur la sécrétion biliaire.
C.R.Ac.Sc. 1958 - 246 - 2300, 2302.
- GREIB (E), DUQUENOIS (P) - 441 - Action antibiotique de l'extrait de pilsella et de l'hydroxy 7 coumarine et de ses dérivés sur les cultures de Brucella abortus et du B-melitensis.
Bull. Ac. Med. 1954 - 138 - 63.
- GRISEBACH (H), DOERR (N) - 2 - Die pflanzliche Biosynthese des Cumarins.
Z. Naturforsch. 1959 - 15 b - 284, 287.
- GUEGUEN (J) - 152 - Un nouvel anticoagulant : la phényl indane dione.
Thèse Doct. Méd. Paris 1948.
- GUILLEMAN (P) - 373 - Pharmacologie d'un nouveau cholérétique synthétique : 2'-4'-4' triméthoxychalcone.
Gaz. Hop. 1958 - 130 - 215, 216.
- GUMINSKA (M), ECKSTEIN (M), STACHURSKA (B) - 280 - The anticoagulant action of 2-2' arylene bis 1,3 indane dione.
Il Farmaco 1964 - 19 - 653, 660.
- GUNTER (MJ), KIM (RS), MAGEE (DF), RALSTON (H), IVY (AC) - 404 - Choleric potencies of some synthetic compounds.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1950 - 99 - 465, 478.
- GUPTA (VN), SHARIMA (BR), ARORA (RB) - 95 - Pharmacologically active coumarin derivatives. I - Mannich base from umbelliferone and 4 methyl umbelliferone.
J. Sc. Ind. Res. India 1961 - 20 B - 300, 305.
- HALPERN (BN) - 289 - Action de substances modifiant la perméabilité capillaire, en particulier la rutine et l'adrénaline.
C.R.S.Biol. 1949 - 143 - 825, 827.

- HANO (K), KANI (SU), HAGIHARA (A) - 147 - Titre japonais -
Fol. Pharmacol. Japon 1958 - 54 - 77.
- HANSEN (OE), HOLTEN (C) - 159 - Uricosuric effect of dicumarol.
The Lancet - 17 Mai 1958 - 1047, 1048.
- HARTERT (H) - 300 - Blutgerünnungstudien mit der Thromboelastographie.
Klin. Wochenschr. 1948 - 26 - 577, 583.
- HARTMAN (W), CLARK (WC) - 229 - Competitive inhibition of dihydroxy
phenyl alanine (Dopa) decarboxylase.
Fed. Proc. 1953 - 12 - 62, 63.
- HARTMAN (W), CLARK (WC) - 231 - Competitive inhibition of 3,4 dihydroxy
phenyl alanine (Dopa) decarboxylase in vitro.
J. Biol. Chem. 1955 - 216 - 507, 529.
- HAUSS - 362 - Début et étiologie de la sclérose vasculaire.
Concours Médical 1963 -51 - 7059.
- HEYBLON (R) - 298 - Essai clinique d'une pommade anti-inflammatoire
en pathologie veineuse.
Gazette Médicale de France 1960 - Avril - 1019, 1020.
- HILDEBRANDT - 402 - in FORSTER (W), OETTEL (H).
Über die choleretische Wirkung hydroaromatischer carbonsäuren.
Arch. exp. path. U. pharmak. 1954 - 222 - 244, 247.
- HIJMANS VAN DEN BERGH (A), GROTEPASS (W) - 446 - An improved
method for the determination of bilirubin in blood.
Brit. Med. J. 1934 - 1 - 1157, 1159.
- HINMAN (JW), CARON (EL), HOEKSEMA (H) - 57 - The structure
of novobiocin.
J. Am. Chem. Soc. 1957 - 79 - 3789, 3800.
- HOEKSEMA (H), CARON (EL) - 61 - 3 amino 4-7 dihydroxy 8 méthyl-
coumarine and amine derivatives thereof.
Brevet U.S.A. 1960 Upjohn Company n° 2 - 929, 821.
- HOFMANN (R), RAPPE (S) - 365 - Wandel und Erfolg in der Behandlung
oberflächlicher Thrombophlebitiden durch die Butazolidin therapie bei
30.937 wöchnrinnen an den Städtischen Franenklinik Nurnberg inner.
Zentralblatt für Phlebologie 1964 - 3 - 152, 157.

- ISHIFUKU (K), SAKURAI (H), OKAMOTO (H), SATO (S). - 74 -
Studies on synthesis and anthelmintic action of hydroxy coumarin derivatives.
J. Pharm. Soc. Japan. 1953 - 73 - 332, 334.
- ITO (Y), KITAGAWA (H) - 24 - Coumarin derivatives for medicinal purposes. V - anthelmintic action.
J. Pharm. Soc. Japan 1953 - 73 - 107, 110.
- ITO (Y), KITAGAWA (H), HIRAMORI (T), SUZUKI (Y), YAMAGATA (M) - 22 - Coumarin derivatives for medicinal purposes. IV - Sedative and hypnotic action.
J. Pharm. Soc. Japan 1951 - 71 - 686, 692.
- ITO (Y), KITAGAWA (H), HIRAMORI (T), SUZUKI (Y), YAMAGATA (M) - 25 - Coumarin derivatives for medicinal purposes. III - Analgesics.
J. Pharm. Soc. Japan 1953 - 71 - 686, 688.
- ITO (Y), KITAGAWA (H), ISHII (H) - 26 - Coumarin derivatives for medicinal purposes. VI - Sedative and hypnotic actions.
J. Pharm. Soc. Japan 1953 - 73 - 351, 355.
- ITO (Y), KITAGAWA (H), SUZUKI (Y) - 21 - Coumarin derivatives for medicinal purposes. II - The toxicity of coumarin, 2 thio coumarin and 4 methyl coumarin.
J. Pharm. Soc. Japan 1951 - 71 - 483, 485.
- ITO (Y), KITAGAWA (H), TAMAOKI (B), TSURUFUJI (S) - 20 - Coumarin derivatives for medicinal purposes. I - Anthelmintic action.
J. Pharm. Soc. Japan 1950 - 70 - 730, 733.
- JAMWAL (KJ) - 100 - The respiratory stimulant effect of 7 methoxy 8 isopentenyl coumarin (osthol) a naturally occurring coumarin.
Arch. Int. Pharm. 1964 - 147 - 351, 354.
- JANBON (M), FLANDRE (O), DAMON (M), JANBON (F) - 340 -
Activité anti-inflammatoire de l' α -chymotrypsine.
C.R.S.Biol. 1961 - 155 - 2427, 2428.
- JANSEN (KF), JENSEN (KA) - 282 - Constitution and hemorrhagic action of 3-3' methylene bis (4 OH coumarine).
Z. Physiol. Chim. 1942 - 277 - 66, 73 (in C.A. 1942 - 37 - 5383⁵).

- JAVILLIER (M), LAVOLLAY (J) - 217 - Les substances agissant sur la résistance et la perméabilité capillaire et la notion de vitamine P.
J. Helv. Chim. Acta. 1946 - 29 - 1283, 1289.
- JHAVERI (SC), KHORANA (ML), MOTIWALA (DK) - 41 - Antiseptic activity of coumarins and flavones.
Indian J. Pharm. 1950 - 12 - 42, 44.
- JOIS (HS), MANJUNATH (BL), RAO (SV) - 102 - Seeds of *Psoralea conglifolia*.
J. Indian Chem. Soc. 1933 - 10 - 41, 42.
- JONGE (MC), NAUTA (WT) - 79 - The analgesic effect of 4 OH coumarin.
Arzneimittel Forsch. 1960 - 10 - 463, 465.
- JUDAH (JD) - 353 - Mode of action of the nitrophenols.
Proc. of the Royal Soc. of Med. 1952 - 45 - 574.
- JUDIS (J) - 116 - The photo oxydation of Dopa in the presence of 8 methoxy psoralen.
J. Pharm. Sc. 1960 - 49 - 447, 450.
- KABAT (H), STOHLMAN (EF), SMITH (MI) - 261 - Hypoprothrombinaemia induced by administration of indane dione derivative.
J. Pharmacol. 1944 - 80 - 160, 170.
- KACZKA (A), WOLF (FJ), RATHE (FP), FOLKERS (K) - 54 - Cathomycin isolation and characterisation.
J. Am. Chem. Soc. 1955 - 77 - 6404, 6405.
- KACZKA (EA), SHUNK (CH), RICHTER (JW), WOLF (FJ), GASSER (MM), FOLKERS (K) - 55 - Novobiocin III - Cyclonovobiocin acide, a methyl glycosid and other reaction products.
J. Am. Chem. Soc. 1956 - 78 - 4125, 4127.
- KADATZ (R) - 337 - Pharmacologische Eigenschaften des 2 (β -chloräthyl) 2,3 dihydro 4 oxo (benzo 1,3 oxazin) - s neuen antiphlogisticum.
Arzneimittel Forsch. 1957 - 7 - 651, 654.
- KALOW (W) - 403 - Cholereuse durch synthetische Mittel. I - Quantitative und qualitative effekt des phenyl methyl carbinols bei der Ratte.
Arch. Exp. Path. und Pharmak. 1949 - 206 - 35, 42.

- KARRER (P), GEIGER (A), RUEGGER (A), SCHWAB (C) - 245 -
Synthèse de la 2 phytyl 1,4 naphtoquinone.
Helv. Chim. acta. 1940 - 23 - 585, 590.
- KAUFMAN (HP) - 277 - Médicaments de synthèse.
Masson Ed. Paris 1957.
- KAUFTHEIL (L), RAPPOPORT (F) - 369 - Experimentelle untersuchungen
über die galle treibende Wirkung der icterischen Galle.
Arch. Exp. Path. Pharmacol. 1932 - 168 - 654, 656.
- KITAGAWA (H) - 31 - Coumarin derivatives for medicinal purposes.
IX - Hypnotic potency ratio and safety index of 4 methyl coumarin,
3 coumarin carboxylic acid diethylamide and barbital.
J. Pharm. Soc. Japan. 1956 - 76 - 578, 581.
- KITAGAWA (H) - 32 - Coumarin derivatives for medicinal purposes.
X - Relation between hypnotic action and physicochemical properties
and distribution into brain and liver in vivo.
J. Pharm. Soc. Japan 1956 - 76 - 582, 587.
- KITAGAWA (H) - 33 - Coumarin derivatives for medicinal purposes :
XI - Effect of coumarin derivatives on respiratory enzyme system.
J. Pharm. Soc. Japan 1958 - 78 - 491, 497.
- KITAGAWA (H), IWAKI (R) - 35 - Coumarin derivatives for medicinal
purposes. XIII - Hypothermal action.
J. Pharm. Soc. Japan 1958 - 79 - 639, 642.
- KITAGAWA (H), IWAKI (R), NOGUTI (T) - 36 - Coumarin derivatives
for medicinal purposes. XIV - The role of coumarin derivatives on the
hypothermal action.
J. Pharm. Soc. Japan 1960 - 80 - 1754, 1759.
- KOLLER (F), LOELIGER (A), DUCKERT (F) - 255 - Experiments on
a new clotting factor (Facteur VII).
Acta Haematol. 1951 - 6 - 1, 18.
- KOO (J) - 197 - β pyridylacrylophenol and analogs. New class of active
coronary dilating agents.
J. Pharm. Sc. 1964 - 53 - 1329, 1332.

- KOPTELOVA (M) - 279 - Anticoagulant properties of thiocyanato derivatives of 2 substituted indane diones.
Latvijas P S R Zinatun Akad. Vestis 1962 - 10 - 113, 119.
(C.A. 1963 - 58 - 14.601 g).
- KOPTELOVA (M) - 284 - Experimental studies of a new anticoagulant drug, omepine.
V.M. Klim. 1962 - 8 - 396, 401. (in C.A. 1963 - 58 - 2.766 c).
- KORTING (GW), FRIEDERICK (HC), ADAMS (W) - 109 - Tyrosine - Tyrosinase Reaction.
Dermatol. Wochsch 1953 - 38 - 934, 939.
- KOSS (FW), BEIZENHERZ (HG), HUBER (I), EISELE (M) - 475 - Stoff Wechselfersuche mit 1 phenyl 1 hydroxy n pentane.
Arzneimittel Forsch. 1965 - 14 - 195, 198.
- KOVALCIK (J), PECHAN (I), SMIESKO (V), FISCHEROVA (V) - 278 - New derivatives of indane dione anticoagulant.
Arch. Expt. Path. Pharmacol. 1959 - 236 - 288, 289.
(C.A. 1959 - 53 - 13.410 b).
- KOVALCIK (V), VALACH (J), PECHAN (I), HRNCIAR (P) - 311 - Die Hypoprothrombinänische Wirksamkeit der Substituierten p.phenyl indane dione.
Bratislav. lekarske lesty 1960 - 40 - 198, 205.
- KOZIOL (SJ) - 323 - Réévaluation des qualités d'une thromboplastine dans le cadre des théories enzymatiques de la coagulation.
Hemostase 1962 - 2 - 179, 181.
- KREITMAIR (H) - 89 - Asperula odorata der Waldmeister.
Pharmazie 1949 - 4 - 140, 141.
- KRISHNA MOHAN RAO (KSR), SUBBA RAO (NV) - 63 - Synthesis of some novobiocin analogues.
Current Science 1964 - 20 - 614, 616.
- KUBOVIC (M), PRAZIC (M), ATANACKOVIC (D) - 75 - Analgesic property of vitamin K.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955 - 90 - 660, 662.
- KÜCHCLE (HJ), WEGENER (H) - 291 - Quantitative investigations on the effectiveness and the power of inflammation inhibiting substances.
Z. ges. exp. med. 1951 - 118 - 136, 142. (in C.A. 1952 - 46 - 7.238 b)

- KUMAR (S), JOSHI (SS) - 96 - Mannich bases from 7 OH 4 methyl 6 ethyl and 7 OH 4,6 dimethyl coumarin as possible CNS stimulants. J. Indian Chem. Soc. 1965 - 42 - 57, 59.
- KUSKE (H) - 103 - Photosensitization of the skin by plant substances. I - Light sensitization by furocoumarin as a cause of various plant dermatose. Arch. Dermatol. Syphilis 1938 - 178 - 112, 123.
- LA BARRE (J) - 395 - Etude expérimentale comparative au sujet de divers cholagogues et cholérétiques synthétiques. J. Thérapeut. Paris 1955 - 355, 379. G. Douin Ed.
- LACOUR (F) (Mme), OBERLING (Ch), GUERIN (M) - 148 - Influence de l'éthyl dicoumarol sur l'évolution des métastases de l'épithelionie T 8 chez le rat. Nouvelles recherches. Bull. du Cancer 1957 - 44 - 88, 91.
- LAMOTTE (M) - 325 - Introduction à la biologie quantitative. Masson et Cie Ed. Paris 1948.
- LANGENDORFF (O) - 188 - Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflüger's Arch. ges. Physiol. 1895 - 61 - 291, 294.
- LARCAN (A), HURIET (C), VERT (P) - 361 - Bases biochimiques de l'angiopathie diabétique : Mécanisme physiopathologie de l'artériosclérose chez le diabétique - Mécanisme physiopathologie de l'angiopathie diabétique. Ann. de Biol. Clin. 1961 - n° 7-9 - 606, 613.
- LAVOLLAY (J) - 216 - Vitamine P. L'esculétine et la résistance capillaire des cobayes. C.R.S.Biol. 1945 - 139 - 270, 272.
- LAWSON (W) - 132 - Oestrogenic activity of some derivatives of isoflaven and isoflavanol. J. Chem. Soc. 1954 - 4448, 4450.
- LECOMTE (J), VAN CAUWENBERGHE (H), VLIERS (M) - 331 - Oedème au Dextran et médicaments anti-inflammatoires. Arch. Intern. Pharmacodyn. 1959 - 121 - 65, 69.

- LEGER (H), BABIN (R), BEAUVIEUX (J), COUSTOU (F) - 211 -
L'action de certains dérivés flavoniques et de leur chelates sur l'armature élastique des artères au cours de l'athéromatose provoquée chez le poulet et le lapin.
Thérapie 1960 - 15 - 1085, 1095.
- LENZI (E), TUCCE (G) - 206 - Modification in lipide metabolism of atherosclerotics treated with a coumarinic drug.
Minerva Med. 1959 - 50 - 2483, 2490.
- LERNER (AB), DENTON (CR), FITZPATRICK (TB) - 107 - Metabolism of phenylalamine and tyrosine.
J. Invest. Dermatol. 1953 - 20 - 299, 302.
- LERNER (AB), FITZPATRICK (TB) - 106 - Biochemistry of melanin formation.
Physiol. Rev. 1950 - 30 - 91, 126.
- LERNER (AB), LEE (TH) - 108 - Isolation of homogeneous melanocyte stimulating hormone from hog pituitary gland.
J. Am. Chem. Soc. 1955 - 77 - 1066, 1067.
- LESPAGNOL (A) - 92 - Sur quelques dérivés coumariniques.
Ann. Pharm. Fr. 1964 - 92 - 131, 136.
- LESPAGNOL (A), BLERENS (H), GUINGUET (E), LESPAGNOL (C) - 440 - Substances tuberculostatiques.
B.S.C.Biol. 1952 - 34 - 606, 607.
- LEVITAN (BA) - 174 - Rutin and histamin shock.
P.S.E.B.M 1949 - 68 - 569, 571.
- LEVITAN (BA) - 214 - Inhibition of testicular hyaluronidase activity by rutin.
P.S.E.B.M 1948 - 68 - 566, 568.
- LINET (O), KREJCI (I), SCHREIBROVA (H), MIKULASKOVA (J) - 397 - Uber den choleretischen effect einiger carbinole.
Atzneim. Forsch. 1962 - 12 - 347, 352.
- LINK (KP) - 259 -
Harvey Lectures 1943 - 39 - 162.

- LOBOVA (TM) - 203 - Effect of glutathione, rutin and vitamin B 1 and B 2 on the cholesterol level of the brain blood and liver of chicke. with alimentary hypercholesterolemia.
Byull. Eksptl. Biol. i Med. 1961 - 51 - 46, 48.
- LOOMIS (WF), LIPMANN (F) - 352 - Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxydation.
J. Biol. Chem. 1948 - 173 - 807, 808.
- LOWENTHAL (J), MAC FARLANE (JA) - 285 - Vit. K like and antivit. K like - Activity of substituted p. benzoquinone.
The J. of Ph. Exp. Therap. 1965 - 147 - 130, 138.
- MACABIES (J), GONDARD (L), BOUVIER (R), BASSERES (J) - 462 - Action du diméthyl iodure du 2-2-diphényl 4 isopropyl amino butyramide sur le spasme du sphincter cystique du cobaye.
C.R.S.Biol. 1961 - 155 - 341, 342.
- MAC NICOL (GP - 235 - Effect of anticoagulant drugs on platelets aggregation in the chandlers tube.
The Lancet 1965 - 3 Avril - 729.
- MAGNUS (R) -454 - Versuche am Überlebenders Dündarm von Säugetaren.
Arch. Anat. Physiol. Lpz. 1904 - 102 - 123 et 349.
- MAHAL (HS) - 72 - Pharmacology of certain flavones with special reference to their anthelmintic action.
Proc. Indian Acad. Sci. 1937 - Sect. 5 B - 186, 194.
- MANET (L), MOURAD (M) - 324 - Les effets de l'héparine et des substances antihépariniques, sur le dosage du fibrinogène.
A.B.C. 1963 - 5-6 - 405, 416.
- MARAZZI-UBERTI (E), TURBA (C) - 419 - L'acido α , α dietil 1-naftilacetico (DA 808) nuovo coleretico di sintesi.
Arch. Int. Pharm. 1965 - 154 - 297.
- MARCY (R), DAVY (M) - 350 - Activité anti-inflammatoire de la phényl-butazone administrée par voie cutanée.
Thérapie 1960 - 15 - 726, 732.

MARTH (W) - 477 - Metoclopramid bei gallenvegdyskinesien. Ein Beitrag zum Dyskinesieproblem.

Med. Klin. Dtsch. 1966 - 61 - 2002, 2006.

MARTIN (GJ), BEILER (JM) - 121 - Effect of phosphorylated hesperidin a hyaluronidase inhibitor, on fertility in the rat.

Science 1952 - 115 - 402.

MARTIN (GJ), SWAYNE (V) - 228 - Effectiveness of vit. P compounds in counteracting anticoagulant action of dicoumarol.

Science 1949 - 109 - 201, 202.

MARTIUS (C) - 356 - Die Stellung des Phyllochinon (vit. K1) in der Atmungskette.

Biochemische Zeitschrift 1954 - 326 - 26, 27.

MASSARANI (E), NARDI (D), BARZAGHI (F), BONACINA (F) - 187 - Nuovi derivati dell α' pirone ad attivita coronarodilatatrice.

Il Farmaco Ed. Sc. 1963 - 18 - 254, 267.

MATHUR (CN), MITRA (NR), KRISHNASWAMY (RK), ARORA (RB) - 190 - The effect of some coumarin derivatives on the coronary flow and their structure activity relationship.

Arch. Int. Pharmacodyn. 1965 - 153 - 218, 225.

MEAD (J), SMITH (JN), WILLIAMS (RT) - 445 - The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4 methyl umbelliferone and their use in fluorimetric determination of β glucuronidase.

Biochem. J. 1965 - 61 - 569, 573.

MENKIN (V) - 222 - Biochemical Feature in inflammation.

6e Congrès International de Thérapeutique - Strasbourg 1959 - 239, 273.

MENKIN (V) - 294 - Anti-inflammatory activity of some water soluble bioflavonoïds.

Am. J. Physiol. 1959 - 196 - 1205, 1210.

MENTZER (C) - 268 - Les divers groupes de substances synthétiques douées d'une activité antivitaminique K et la signification biologique des résultats obtenus.

B.S.C.B. 1948 - 30 - 872, 884.

- MENTZER (C) - 287 - Recherches chimiques sur quelques nouvelles substances capables de modifier le taux de prothrombine.
Thèse Sci. Nat. Paris 1947.
- MENTZER (C), GLEY (P), MOLHO (D), BILLET (D) - 125 -
Substances œstrogéniques dans la série des coumarines.
Bull. Soc. Chim. France 1946 - 13 - 271, 276.
- MENTZER (C), MEUNIER (P) - 288 - Une méthode générale de synthèse des chromones substituées en 3.
Bull. Soc. Chim. 1944 - 11 - 302, 305.
- MESSINGER (WJ), POROSOWSKA (V) - 204 - Influence of phosphorylated hesperidin on fat tolerance curves in vivo and in vitro.
Appl. Physiol. 1953 - 6 - 173, 176.
- MEUNIER (P) - 250 - Le mécanisme d'action des antivitamines K chez les animaux.
B.S.C.B. 1948 - 30 - 884, 891.
- MEUNIER (P), MENTZER (C) - 248 - Activité antihémorragique de quelques dérivés du chromane. La notion d'antivitamine K.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943 - 25 - 80, 87.
- MEUNIER (P), MENTZER (C), BUU-HOI - 263 - Dérivés isomorphes des naphtoquinones et du phtiocol ayant une activité hémorragipare.
B.S.C.B. 1945 - 27 - 191, 194.
- MEUNIER (P), MENTZER (C), MOLHO (D) - 264 - Activité antivitaminique K d'une indane dione.
C.R.Ac. Sc. 1947 - 224 - 1664, 1667.
- MEUNIER (P), MENTZER (C), VINET (A) - 273 - Dérivés de monocoumarines douées d'activité antivitaminique K.
Helv. Chim. Acta 1946 - 29 - 1291, 1297.
- MEYER (RF) (Parke Davis) - 153 -
Brevet U.S. 1963 n° 3.089.878.
- MEYER (OO), BINGHAM (JB), AXELROD (VH) - 242 - Studies on the hemorrhagic agent 3, 3' methylene bis (4 hydroxy coumarin).
II - The method of administration and dosage.
Am. J. Med. Sci. 1942 - 204 - 11, 21.

MICHAELS (L) - 150 - Cancer incidence and mortality in patients having anticogulant therapy.

The Lancet 1964 - 17 Oct. - 832, 835.

MICHAELIS (M), QUASTEL (JM) - 86 - The site of action of narcotics in respiratory processes.

Biochem. J. 1941 - 35 - 518, 533.

MICHELI (RA), BOOTH (AN), LIVINGSTON (AL), BICKOFF (EM) - 140 - Coumestrol, plant phenolies, and synthetic estrogens : a correlation of structure and activity.

J. Med. Pharm. Chem. 1962 - 5 - 321, 335.

MILLAR (GJ), HENRIET (M), JAQUES (LB) - 322 - Antagonistic and antidotal action of vit. K 1 and K 3 versus dicumarol in drugs.

P.S.E.B.M 1965 - 119 - 1093, 1097.

MILSTEIN (J) - 364 - Essai thérapeutique de la P.I.D. sous forme de suppositoires dans la maladie hémorroïdaire.

Concours Médical 1960 - 19 Mars - n° 12 - 1509, 1511.

MOFFETT (RB) - 90 - Oxazolo coumarins.

J. Med. Pharm. Chem. 1962 - 5 - 335, 338.

MOFFETT (RB) - 91 - Central nervous system depressants. VII - Pyridyl coumarins.

J. Med. Pharm. Chem. 1964 - 7 - 446, 449.

MOLHO (D) - 1 - Préparation synthétique et mode d'action de quelques hypoprothrombinémiants. Relations entre la structure chimique et l'activité pharmacologique.

Thèse Doct. ès-sciences Nat. - Fac. Sc. Lyon 1953.

MOLHO (D) - 256 - Le mode d'action du 2 phényl 1,3 indane dione.

L'interférence avec le facteur VII de la coagulation.

C.R. Ac. Sc. 1952 - 234 - 1323, 1325.

MOLHO (D) - 281 - Relations structurales et activité hypoprothrombinémiante.

Conf. Int. sur Thromboses et embolies - Bâle 1954 - Benno Schwabe

Editeur p. 193, 199.

MOLHO (D) - 351 - Communication personnelle.

- MOLHO (D), BOSCHETTI (E), FONTAINE (L) - 378 - Nouveau médicament cholérétique dans la série des coumarines.
B.S.M. 1961 n° 1430.
- MOLHO (D), BOSCHETTI (E), FONTAINE (L) - 379 - Nouveaux médicaments cholérétiques de la série des hydroxy-coumarines.
B.S.M. 1962 n° 2321.
- MOLHO (D), MOREAUX (J), MEUNIER (P) - 267 - Antivitamines K. V - Activité hémorragipare du 2 méthoxy 1,4 naphthoquinone et des composés voisins.
B.S.C.B 1948 - 30 - 637, 642.
- MONNET (L) - 447 - Contribution à l'étude du dosage des pigments biliaires du sérum sanguin.
Thèse pharmacie Lyon 1961.
- MONTIGEL (C), PULVER (R) - 304 - Tierexperimentelle untersuchungen über ein neues 4 oxy cumarin derivat geigy 23.350.
Conf. Int. sur les thromboses et embolies Bâle 1954 - p. 250, 258.
Benno Schwabe Editeur.
- MORETTI (GF), STAEFFEN (J), LORRAIN (J), ROUX (M), ROUSSEAU (J) - 366 - La corticothérapie des phlébites.
J. Med. Bordeaux 1960 - 137 - 596, 602.
- MORIN (R), MAILLARD (J), BENARD (M) - 408 - Etude pharmacodynamique du α (hydroxy 1 cyclo hexyl) butyrate de sodium - Hébutol.
Sem. Thérap. 1958 - Fév. - 230, 235.
- MORIN (H), ROUX (M), JACHET (MT) - 196 - Etude pharmacologique et toxicologique d'un vasodilatateur coronaire, la flavone 7 oxyacétate d'éthyl (Recordil).
Thérapie 1964 - 19 - 1555, 1568.
- MORS DORF (K), BODE (HH) - 342 - Zur Beeinflussung der permeabilitätsteingernfen Wirkung der serotonin durch verschiedenartige Pharmaka.
Arch. Int. Pharm. 1959 - 128 - 292, 297.
- MOUQUIN (M), MACREZ (CI) - 194 - Essai de traitement de l'angine de poitrine par un nouveau principe actif extrait de l'amni visnaga (Provismine) différent de la khelline.
Presse Médicale 1960 - 68 - 257 - 258.

- MURPHY (EA), MUSTARD (JF) - 234 - Dicumarol therapy - Some effects on platelets and their relationship to clotting tests.
Circ. Research 1960 - 8 - 1187, 1199.
- MURPHY (EA), MUSTARD (JF), ROWSELL (HC), DOWNIE (HG) - 257 - Quantitative studies on the effects of dicoumarol on experimental thrombosis.
J. Lab Clin. Med. 1963 - 61 - 535, 941.
- MURPHY (RC), SEEGER (WH) - 315 - Concentration of prothrombin and ac. globulin in various species.
Am. J. Physiol. 1948 - 154 - 134, 139.
- MUSAJO (L), RODIGHIERO (G) - 119 - Photo-reaction between some furocoumarin and flavine mononucleotide.
Nature 1961 - 190 - 1109, 1110.
- MUSAJO (L), RODIGHIERO (G), CAPORALE (G) - 110 - The photodynamic activity of the natural coumarins.
Chim. Ind. 1953 - 35 - 13, 15. (C.A. 1954 - 48 - 4111 h).
- MUSAJO (L), RODIGHIERO (G), CAPORALE (G) - 113 - Relation between constitution and photodynamic properties of fluoro coumarins.
Farmaco Pavia Ed. Sc. 1958 - 13 - 355, 362. (C.A. 1959 - 53 - 6222).
- NAGHSKI (J), COPLEY (MJ), COUCH (JF) - 40 - Effect of flavonal on the bacteriostatic action of dicoumarol.
Science 1947 - 105 - 125, 126.
- NAKABAYASHI (T) - 27 - Coumarin derivatives. VI - Synthesis of methyl derivatives of dihydrocoumarins and their anthelmintic action.
J. Pharm. Soc. Japan. 1954 - 74 - 23, 26.
- NAKABAYASHI (T) - 29 - Coumarin derivatives. VIII - Synthesis of methyl derivatives of octohydro coumarins and their anthelmintic action.
J. Pharm. Soc. Japan. 1954 - 74 - 895, 898.
- NAKABAYASHI (T) - 30 - Coumarin derivatives. IX - Anthelmintic action of thiacoumarin derivatives.
J. Pharm. Soc. Japan 1954 - 74 - 898, 901.

- NAKABAYASHI (T), MIYAZAKI (H), TOKOROYAMA (T) - 23 -
Anthelmintic action of methyl 1, hydroxy and methoxy derivatives of coumarin.
J. Pharm. Soc. Japan. 1953 - 73 - 565, 568.
- NAKABAYASHI (T), YAMASAKI (K) - 28 - Coumarin derivatives.
VII - Synthesis of 7 methyl 3 alkyl coumarins and their anthelmintic action.
J. Pharm. Soc. Japan 1954 - 74 - 590, 593.
- NASINI (AG) - 442 - Determination by Wood light.
Atti 3 congresso Naz. Chim. pura applicata 1930 - 668, 678.
(C.A. 1931 - 25 - 2386).
- NITZ (RE), POTZSCH (E) - 189 - 3(β diäthylaminoäthyl) 4 methyl 7 carbäthoxymethoxy 2 oxo (1,2 chromen) ein Preparat mit spezifischer und lang anhaltender coronargefässer.
Wertender Wirkung Arzn. Forsch. 1963 - 13 - 243, 251.
- NOYES (HE), NAGLE (SC), SANFORD (JP), ROBBINS (ML) - 56 -
Novobiocin and PA 105 : in vitro and in vivo studies on effectiveness against micrococcus pyogenes.
Antibiotics and chemotherapy 1956 - 6 - 450, 455.
- OKUI - 151 - Titre en Japonais.
Tohoku J. Exp. Med. 1938 - 32 - 233.
- OKUMURA (K), ASHINO (K), OKUDA (T) - 62 - Novobiocin and related compounds synthesis of 3 acylamino 4 hydroxy coumarin derivatives.
J. Pharm. Soc. Japan. 1961 - 81 - 1482, 1485.
- ORANCEY-POTIER (A), BUZAS (A), LEDERER (E) - 66 -
Calophyllolide et acide calophyllique extraits de calophyllum morphyllum.
Bull. Soc. Chim. 1951 - 577, 580.
- OVERMAN (RS), STAHMANN (MA), HUEBNER (CF), SULLIVAN (WR) LINK (KP) - 274 - Hemorrhagic sweet clover disease. XII - Anticoagulant activity and structure in the 4 hydroxy coumarin group.
J. Biol. Chem. 1944 - 153 - 5, 24.

- OVERMAN (RS), STAHMANN (MA), LINK (KP) - 249 - Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. VIII - Effect of 2 methyl 1,4 naphthoquinone and L ascorbic acid on the action of 3, 3' methylene bis (4 hydroxy coumarin) on the prothrombin time of rabbits.
J. Biol. Chem. 1942 - 145 - 155, 162.
- OWREN (PA) - 253 - The coagulation of blood - Investigation on a new clotting factor.
Acta Med. Scand. 1947 - 194 (suppl.) - 327 pages.
- OWREN (PA) - 302 - Control of anticoagulant therapy.
Lancet 1959 - I - 600, 602.
- OWREN (PA) - 303 - Thrombotest. A new method for controlling anticoagulant therapy.
Lancet 1959 - II - 754, 758.
- OWREN (PA), AAS (K) - 299 - Control of dicoumarol therapy and the quantitative determination of prothrombin and proconvertin.
Scand.J. Clin. Lab. invest. 1951 - 3 - 201, 208.
- PACKMAN (AM), RUBIN (N) - 177 - Synthesis of chalcones with potential adrenergic blocking activity.
Am. J. Pharm. 1962 - Janvier - 35, 40.
- PANIGRAHI (AK), JESTHI (PK) - 165 bis - Studies of spasmolytic hydroxy 4 coumarins.
J. Proc. Inst. Chem. India 1966 - 38 - 171, 174.
- PARIS (R) - 6 - Les flavonoïdes.
Prod. Pharm. 1951 - 6 - 543, 554.
- PARIS (R), MOURY (J) - 223 - Action sur la perméabilité capillaire de divers types de flavonoïdes.
Ann. Pharm. Fr. 1964 - 22 - 489, 493.
- PARIS (J), VANLERENBERGHE (J), GODCHAUX (R) - 460 - Action sur la vésicule biliaire isolée de cobaye du nicotiny l amino 1-2 diphényl éthane (C 1065).
Thérapie 1956 - 11 - 1051, 1053.
- PARROT (JL), COTEREAU (HY) - 215 - L'économie de l'acide L-ascorbique dans l'organisme.
Revue Intern. de Vitaminologie - 1957 - 27 - 545, 564.

- PASECHNIK (Kh) - 481 - Effects of noradrenaline on the sphincter of Oddi.
Farmakol i Toxikol 1959 - 22 - 519, 522.
- PASERO (G) - 162 - Über die urikosurische Wirkung antiprothrombinamischer Substanzen und einiger neuer indane dione derivative.
D. Med. Wochens. 1960 - 85 - 855, 856.
- PASERO (G), MARINI (N) - 158 - Sull'azione uricurica degli antiprotrombinici di sintesi.
Arch. E. Maragliano patol. e clin. 1958 - 14 - 297, 305.
- PASERO (G), MARINI (N) - 283 - Sull'azione uricurica del 2 fenil 5 bromo 1,3 indane dione.
Gazz. Med. Ital. 1958 - 117 - 561, 567.
- PATEL (RP), PATEL (MP) - 182 - Effects of heparin, treburon, dicoumarol and tromexan on blood vessels.
Ind. J. Med. Res. 1959 - 47 - 169, 173.
- PATHAK (MA), FELLMAN (JH) - 117 - Activating fluorescent wave lengths of fluörocoumarins : Psoralen.
Nature 1960 - 185 - 382.
- PATHAK (MA), FELLMAN (JM), KAUFMAN (KD) - 118 - The effect of structural alteration on the erythematous activity of fluorocoumarins : Psoralen.
I. Invest. Dermatol. 1960 - 35 - 165, 183.
- PATHAK (MA), FITZPATRICK (TB) - 114 - Relationship of molecular configuration to the activity of furocoumarins which increase the cutaneous responses following long wave ultraviolet radiation.
J. Invest. Dermatol. 1959 - 32 - 255, 262.
- PATHAK (MA), FOWLKS (WL) - 120 - The in vivo destruction of succinic deshydrogenase activity of guinea pig skin by photosensibilisation with psoralen or methoxalen.
J. Invest. Dermatol. 1961 - 37 - 183, 187.
- PATZAK (R), NEUGEBAUER (L) - 444 - Polarographic investigation of coumarin.
Monatsh 1952 - 83 - 776, 785 (C.A. 1953 - 47 - 5274 h).

- PESSON (M), SALLE (J), AUFFRET (C) - 375 - Activités cholérétiques et cholagogues des dérivés de l'acide cinnamique et de l'acide α phénylcinnamique.
Arch. Int. Pharm. 1959 - 119 - 443, 482.
- PLUNGIAN (MB), MUNCH (JC), WOLFFE (JB) - 227 - Effect of rutin on coagulation time of rat blood.
J. Pharm. Exp. Therap. 1948 - 93 - 383, 387.
- PREZIOSI, BIANCHI - 183 - On the pulmonary and cardiovascular effects in Warfarine Na.
Arch. Int. Pharm. 1959 - 123 - 227, 238.
- PUKIREV (AG) - 443 - Beta methyl ombelliferone a fluorescing indicator.
Zavodskaya lab. 1934 - 3 - 1038, 1039.
- PUNTURIERI (E), BOSI (L) - 412 - Behaviour of choleresis and of the cholesterol level of the bile in rats treated with 1 phenyl propanol, phenyl ethyl acetic acid and diphenylhexenoic acid.
Gazz. Int. Med. Chir. 1961 - 46 - 1131, 1137.
- QUERCIOLI (E) - 144 - Relation between chemical structures and cytologic action of substituted coumarins.
Atti Accad. Naze Lincei Rend. classe sci. fis. nat. 1954 - 16 - 645, 649. (C.A. 1955 - 49 - 9715).
- QUERCIOLI (E) - 145 - Cytogenetic and cytophysiological actions of substituted coumarins.
Atti Accad. Naze Lincei Rend. classe sci. fis. nat. 1955 - 18 - 313, 318. (C.A. 1955 - 49 - 14067).
- QUICK (AJ) - 238 - The coagulation defect in sweet clover disease and in the hemorrhagic chick disease of dietary origin. A consideration of the source of prothrombin.
Am. J. Physiology 1936 - 118 - 260, 271.
- QUICK (AJ) - 239 - Properties of thromboplastin.
Am. J. Physiology 1936 - 114 - 282, 296.
- QUICK (AJ) - 251 - Role of vitamin K in the synthesis of prothrombin.
Am. J. Physiology 1951 - 164 - 716, 722.

- QUICK (AJ) - 252 - The hemorrhagic diseases and the physiology of hemostases.
Springfield Ill. C. Thornes Ed. 1942.
- QUICK (AJ) - 313 - Qualitative differences in the prothrombin, thromboplastin and thrombin in different species.
J. Biol. Chem. 1938 - 123 - 99, 103.
- QUICK (AJ), STEFANINI (M) - 314 - The concentration of labile factor of the prothrombin complex in human, dog and rabbit blood. Its significance in the determination of prothrombin activity.
J. Lab. and Clin. Med. 1948 - 33 - 819, 826.
- RANDALL (LO), SELITTO (JJ) - 344 - Anti-inflammatory effects of Romular CF.
J. Am. Pharm. Ass. 1957 - 47 - 313, 317.
- REINES (Z), HRABANES (J), VANECEK (R), MANGAKI (M) - 209 - Influence du dérivé de la dicoumarine sur l'athéromatose expérimentale. Conf. Int. sur les thromboses et embolies Bâle 1954 - p. 1146. Benno Schwabe Ed. - Bâle.
- RENAUD (S) - 258 - Anticoagulants in the prevention of endotoxin induced phlebothrombosis in the rat.
J. Lab. Clin. Med. 1965 - 66 - 253, 262.
- REPPPEL (L), SCHMOLLACK (W) - 51 - Preparation of acylamino-coumarins and sulfanilamido coumarins.
Arch. Pharm. 1964 - 297 - 711, 718.
- RIVA (M), MANTEGAZZA (P), MASSARANI (E) - 218 - α pyrone derivatives active in vascular fragility.
Arzn. Forsch. 1962 - 12 - 921, 922.
- ROBELET (A) - 469 - Action de la dextromoramide sur le sphincter d'Oddi. C.R.S.B. 1963 - 157 - 566, 567.
- ROBELET (A), GUERRIN (F) - 433 - L'élimination biliaire des médicaments.
Actualités Pharmacologiques 1966 - 19e série - 91, 126.
- RODERICK (LM) - 237 - The pathology of sweet clover disease in cattle.
J. Am. Vet. M.A. 1929 - 74 - 314, 326.

- RODIGHERO (G), ANTONELLO (C) - 60 - Synthèse de quelques dérivés 3 amino coumariniques, premières données relatives à leurs propriétés antibactériennes.
Boll. Chim. Farm. 1958 - 97 - 115, 117.
- RODIGHERO (G), CAPORALE (G), DOLCHER (J) - 146 - The cytological activity of some furocoumarins and their behaviour toward deoxyribonucleic acid.
Atti. Acad. Naz. Lincei Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat. 1961 - 30 - 84, 89. (C.A. 1962 - 57 - 1315 g).
- RODIGHERO (G), PERISSINOTO (B), CAPORALE (G) - 68 - Tuberculostatic studies with furocoumarins.
Atti Ist. Veneto Sci. Lettere Arti Classe Sci. Mat. Nat. 1956 - 114 - 1, 5 (C.A. 1957 - 51 - 10.736).
- ROHRBACH (P), ROBINEAU (M) - 409 - Etude pharmacologique de cholérétiques de synthèse. I - Modification du débit biliaire.
Arch. Int. Pharmacod. 1958 - 156 - 136, 153.
- ROHRBACH (P), ROBINEAU (M) - 449 - Etude pharmacologique de cholérétiques de synthèse. II - Effet exercé sur la composition de la bile.
Arch. Int. Pharmacod. 1958 - 116 - 154, 169.
- ROSICKY (J) - 260 - Ethyl bis (4 hydroxycoumarinyl) acetate.
Cas. Lek. Cesk. 1944 - 83 - 1200. (Index Merk 7e éd. p. 424).
- ROSKAM (J), LECOMTE (J), VANCAUWENBERGHE (H), HUGUES (J) - 328 - Etude pharmacodynamique des médicaments anti-inflammatoires.
6e Congrès International de Thérapeutique Strasbourg 1959.
- ROUSSEL - 293 - Nouveau médicament pour le traitement des manifestations inflammatoires dans les troubles de la circulation.
B.S.M 1966 n° 5383.
- ROUSSELLE (J) - 297 - Expérimentation clinique de la pommade anti-coagulante Pindione.
Praxis 1958 - 45 - 1078, 1081.
- ROUX (G) - 399 - Activité cholérétique de l'acide béta (diméthoxy 2-4 benzyl 5 benzoyl) propionique.
Thérapie 1960 - 15 - 827, 833.

- ROWSELL - 321 - Blood coagulation in some common laboratory animals.
Lab. Animal Care 1963 - 13 - 752, 762.
- SAMAAN (K) - 166 -
Quat. J. Pharm. Pharmacol. 1938 - 4 - 14.
In SOINE (TO) Naturally occurring coumarins and related physiological activities - J. Pharm. Sci. 1964 - 53 - 231, 264.
- SCHMUTZ (J), HIRT (F), KUNZLE (F) EICHENBERGER (E) - 167 -
Synthesis of basically substituted chromones.
Helv. Chim. Acta 1953 - 36 - 620, 626.
- SCHOFIELD (FW) - 236 - A brief account of a disease of cattle simulating hemorrhagic septicemia due to feeding sweet clover.
Can. Vet. Rec. 1922 - 3 - 74, 76.
- SCHRAUFSTÄTTER (E) - 43 - The bacteriostatic activity of chalcone, flavanone, flavone, flavanol.
Experimentia 1948 - 4 - 484, 485. (C.A. 1949 - 43 - 3488).
- SCHRAUFSTÄTTER (E), DEUTSCH (S) - 44 - Chalcones.
Z. Naturforsch. 1949 - 3b - 163, 171.
- SEEBERGER (E) - 295 - Tierexperimentelle untersuchungen zur prophylaxe der kapillartoxischen Wirkung von dicumarin derivaten.
Arzn. Forsch. 1959 - 13 - 148.
- SELLERI (R), CALDINI (O), SPANO (R), CASCIO (G), PALAZZO-ADRIANO (M) - 380 - Synthesis of new derivatives of coumarin and analysis of their action.
Arzn. Forsch. 1965 - 15 - 910, 913.
- SELLERI (R), ORZALES (G), CALDINI (O), SPANO (R) - 156 -
New coumarin derivatives with saluretic and choleretic activity.
Arzn. Forsch. 1966 - Août - 1073, 1081.
- SETNIKAR (I) - 94 - N substituted 8 amino methyl chromone, a new class of central nervous stimulants.
J. Med. Pharm. Chem. 1961 - 3 - 471, 488.
- SETNIKAR (I), MURMANN (W), RAVASI (MT) - 195 - The coronary vasodilatator activity of morpholino ethyl 3 methyl flavone 8 carboxylate in comparison with the other coronary vasodilators.
Arch. Int. Pharm. 1961 - 131 - 187, 208.

- SHAPIRO (S) - 270 - A new anticoagulant drug : Warfarine sodium.
J. Kansas M. Soc. 1954 - 55 - 687, 692.
- SHIPPLEY (RE), WILSON (C) - 457 - An improved recorded rotameter.
P.S.E.B.M 1955 - 88 - 724, 728.
- SIEVE (BF) - 122 - Phosphorylated hesperidin and fertility of the mice.
Science 1953 - 116 - 373, 374.
- SMITH (CC), FRADKIN (R), LACKEY (MD) - 286 - A hemorrhagic syndrom induced by derivatives of 3 hydroxy 1,4 naphtoquinone.
P.S.E.B.M 1946 - 61 - 398, 403.
- SMITH (E), HOSANSKY (N), BYWATER (WE), VAN TAMELEN (EE) - 193 - Constitution of samidin, dihydrosamidin and visnadin.
J. Am. Chem. Soc. 1957 - 79 - 3534, 3540.
- SMITH (E), PUCCI (LA), BYWATER (WG) - 191 - Crystalline Visnagan.
Science 1952 - 115 - 520, 521.
- SODERBERGER (U), WACHTMEISTER (CA) - 88 - The effect of large doses of 1,3 indane diones and 4 OH coumarins on oxygen consumption of anesthetized cats and rabbits.
J. Pharmacol. 1956 - 117 - 298, 299.
- SOINE (TO) - 19 - Naturally occuring coumarins and related physiological activities.
J. Pharm. Sc. 1964 - 53 - 231, 264.
- SOUGIN-MIBASHAN (R), HORWITZ (M) - 157 - The uricosuric action of biscoumacetate.
The Lancet 1955 - I - 1191, 1192.
- SOULIER (JR), GUEGUEN (J) - 266 - Action hypoprothrombinémiante de la phényl indane dione étudiée expérimentalement chez le lapin. Son application chez l'homme.
C.R.S. Biol. 1947 - 141 - 1007, 1011.
- SOURKES (TL) - 230 - Inhibition of Dopa decarboxylase by derivatives of phenylalamine.
Arch. Biochim. Biophys. 1954 - 57 - 444, 456.

- SPALDING (DP), MOSHER (HS), WHITMORE (FC) - 71 - Heterocyclic basic compounds. XVIII - 4 amino coumarin derivatives.
J. Am. Chem. Soc. 1950 - 72 - 5338, 5339.
- STAHMANN (MA), HUEBNER (CF), LINK (KP) - 240 - The hemorrhagic sweet clover disease. V - Identification and synthesis of the hemorrhagic agent.
J. Biol. Chem. 1941 - 138 - 513, 527.
- STAHMANN (MA), IKAWA (M), LINK (KP) - 269 - 3 substituted 4 hydroxy coumarins.
Brevet U.S 1947 n° 2.427.578.
- STALPORT (J) - 463 - A sensitive method for functional exploration of the Oddi's sphincter.
Arch. Int. Pharm. 1964 - 149 - 441.
- STEKIEL (WJ) - 472 - Choleretic.
Am. J. Ph. 1960 - 198 - 881, 885.
- STERN (P), DE ZELIC (M), KOSAK (R) - 76 - De l'activité analgésique de la vitamine K et du dicoumarol en tenant compte plus particulièrement de la 4 OH coumarine.
Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1957 - 232 - 256, 259.
- STOCKER (JR), BELLIS (DM) - 3 - The biosynthesis of coumarin in *Melilotus alba*.
The J. of Biol. Chem. 1962 - 237 - 2303, 2305.
- STOLL (W), LITVAN (P) - 271 - 3 substituted 4 hydroxy coumarins.
Brevet U.S. 1953 n° 2.648.682.
- STOLL (WG), LITVAN (F) - 305 - Der einfluss der substitution in 4 oxy coumarin derivaten auf die gerinnungsvalenz des blutes.
Conf. Int. thromboses et embolies - Bâle 1954 (Benno Schwabe ed. p. 244, 250).
- SZENT-GYÖRGYI (A) - 212 - Preparation of citrin.
Z. Physiol. Chem. 1938 - 255 - 126, 131. (C.A. 1938 - 32 - 9393⁷).
- TABOURIECH (J) - 479 - L'écorce de tilleul.
Thèse Pharm. Montpellier 1962.

- TAYLOR (NE), HODGKIN (DC), ROLLETT (JS) - 135 - The X ray crystallographic determination of the structure of bromomirestrol.
J. Chem. Soc. 1960 - 3685, 3695. (C.A. 1961 - 55 - 5575 i).
- THEOBALD (W), DOMENJOZ (R) - 341 - Das serotonin ödem der Ratte und seine Beeinflussung durch Antiphlogistica.
Arzn. Forsch. 1958 - 8 - 18, 21.
- THOMPSON (GR), MIKKELSEN (WM), WILLIS (PW) - 160 -
The uricosuric effect of certain oral anticoagulant drugs.
Arthr. Chem. 1959 - 2 - 383, 388.
- TIEMAN (F), REINIER (CL) - 437 - Ueber das umbelliferon und einige seiner derivate.
Ber. 1879 - 12 - 993, 999.
- TRCKA (V) - 306 - Wirkung einiger neuer synthetischer antikoagulantien.
Conf. Int. thromboses et embolies - Bâle 1954 (Benno Schwabe éd. p. 229, 232).
- TSAMBOULAS (N), CRIKELIS (J), ANASTOPOULOS (G), LASANAS (G) - 208 - Effects of coumarin derivatives on cholesterol metabolism.
Prakt. Akad. Athenon 1955 - 30 - 100, 111. (C.A. 1956 - 50 - 14.965)
- TURBANTI (L), DI PACO (GF) - 411 - Acidi α difeniletacetamido β arilacrilici a presenta azione coleretica e ipocolesterolemica.
Il Farmaco Ed. Sc. 1960 - 15 - 406, 413.
- UKITA (T), EJIMA (A) - 49 - Mode of antibacterial activity of 3 acetyl 4 hydroxy coumarin and dehydroacetic acid.
J. Pharm. Soc. Japan 1962 - 82 - 1625, 1630.
- VAILLE (Ch) - 413 - Influence des anesthésiques sur les sécrétions biliaires et pancréatiques.
Ann. Pharm. Fr. 1961 - 19 - 713, 731.
- VAILLE (Ch), ROZE (C), SOUCHARD (M) - 427 - Le pharmacologue doit-il exprimer les doses en fonction du poids corporel.
Prod. Pharm. 1964 - 19 - 103, 109.
- VAIRE (J), COTTE (J), MOLHO (D) - 296 - Nouveaux essais d'anti-coagulants (antivitamines K) en pommade. Action sur la prothrombinémie et sur le suintement.
Bull. Soc. Fr. Derm. et Syph. 1953 - 60 - 300, 301.

- VALETTE (G) - 326 - Précis de pharmacodynamie.
Masson 2e Ed. 1963.
- VAN CAUWENBERGHE - 335 - Propriétés anti-inflammatoires de deux
dérivés de l'antipyrine.
C.R.S.Biol. 1959 - 153 - 1292, 1293.
- VANLERENBERGHE (J), GUERRIN (F), MILBLED (G), ROBELET (A)
- 425 - Activité cholérétique de quelques dérivés de la série du 1 naphthol.
C.R.S.Biol. 1960 - 154 - 728, 731.
- VANLERENBERGHE (J), GUERRIN (F), ROBELET (A) MILBLED (G)
- 428 - Essais de composés cholérétiques chez le rat. Mode d'ex-
pression de la réponse sécrétoire.
C.R.S.Biol. 1960 - 154 - 123, 126.
- VAN ZANTEM (B) - 80 -
Thèse Doctorat Sciences. Amsterdam 1960.
- VARONOS (DD), VOUKYDES (PC), NIKITOPOULO (GC) - 178 -
Digitoxin antagonism by Visnadin.
J. of Pharm. Sc. 1962 - 51 - 1013, 1014.
- VERMEL (EM), ZSETHIN (AL) - 149 - The antitumor activity of some
furocoumarin.
D. Vopr. Orskol. 1964 - 10 - 85, 90 (C.A. 1965 - 62 - 4498 c).
- VIDAL-BERETERVIDE (K), MONTI (M) - 97 - Pharmacological study of
tropylchromone 2 carboxylate and some of its derivatives.
Arzn. Forsch. 1963 - 13 - 452, 454.
- VINCENT (Y) - 221 - Une nouvelle méthode pour la mesure de la perméabi-
lité capillaire. Application à l'étude des facteurs de protection et des
facteurs fragilisants.
C.R.S.Biol. 1959 - 153 - 1825, 1828.
- VIRTANEN (AI), HIETALA (PK) - 47 - Isolation of an antiserotonia factor,
7 hydroxy 4' methyoxisoflavone from red clover.
Acta Chem. Scand. 1958 - 12 - 579, 580.
- VON PECHMAN - 438 - Description de la synthèse de la méthylombelliférone.
Ber. - 17 - 931.

- WAHL - 363 - Anomalies du métabolisme aminé et l'athérosclérose.
(Possibilités de leur prévention).
Vie Méd. 1963 - 44 MT (Juin) - 65, 71.
- WAKIM, CHEN, GATCH - 354 - The immediate effects of 3, 3' methylene bis (4 hydroxycoumarin) on experimental animals.
Surgery Gynecol. Obstet. 1943 - 76 - 323, 326.
- WAKIM (KG), MANN (FC) - 471 - The intrahepatic circulation of blood.
Anat. Rec. 1942 - 82 - 233, 253.
- WALKER (W) - 272 - Preliminary clinical trial of anticoagulant G 23.350.
Conf. Int. thromboses et embolies - Bâle 1954 p. 259, 262.
(Benno Schwabe Edit.).
- WALTON (E), FOLKERS (KA) - 58 - Verfahren zur Herstellung von estern des novobiocin.
Brevet All. Merk and C° 1957 n° 1.076.141.
- WALTON (RP), HANNA (CB), PRYSTOWSKY (RP), LEARY (JS) - 87 - Cardiac and calorigenic action of dicumarol and dinitrophenol.
Fed. Proc. 1949 - 8 - 342.
- WARTELLE (O) - 317 - Les facteurs thromboplastiques du sang de poule et de quelques mammifères.
Thèse Doctorat Université Paris 1958.
- WESTING (J) - 124 - Klinische Prüfung eines per os wirkenden Antikonzep-tikum.
Dtsch. Med. Wochr. 1953 - 78 - 1607, 1609.
- WHITEHOUSE (MW) - 359 - Uncoupling of oxydative phosphorylation by some arylacetic acids (anti-inflammatory or hypocholesterolemic drugs).
Nature 1964 - 4919 (8 Fév.) - 629, 630.
- WHITEHOUSE (MW), HASLAM (JM) - 358 - Ability of some antirheumatic drugs to uncouple oxydative phosphorylation.
Nature 1962 - 4861 (29 Déc. - 1323, 1324.
- WILHELMI (G) - 339 - Über die entzündungshemmende Wirkung Von Corti-son, ACTH, Pyrazolen und antiphlogistica.
Medizinische 1952 - 50 - 1591, 1595.

- WILLETTE (RE) - 185 - Structural studies of certain pharmacologically active coumarins isolated from umbelliferae.
Ph. D. Dissertation - Univ. of Minnesota Minneapolis 1960.
- WILLETTE (RE) - 186 - Structural studies of certain pharmacologically active coumarins isolated from umbelliferone.
Dissert. Abstracts 1961 - 21 - 2896.
- WILLETTE (RE), SOINE (TO) - 165 - Coumarins. I - Isolation, purification and structure determination of pteryxin and suksdorfin.
J. Pharm. Sc. 1962 - 51 - 149, 156.
- WILLIAMS (RT) - 435 - Detoxication mechanism.
Chapman and Hall Ltd London 1959.
- WILLIAMS (RT), MILLBURN (P), SMITH (RL) - 432 - The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs.
Ann. N.Y. Ac. Sc. 1965 - 123 - 110, 124.
- WINDER (CV), WAX (J), SERRANO (B), JONES (EM) - 348 -
Anti-inflammatory and antipyretic properties of N (α - α - α trifluoro-m-tolyl) anthranilic acid (Cl 440 flufenamic acid).
Arthritis and Rheumatism 1963 - 6 - 36, 47.
- WINTER (CA), RISLEY (EA), NUSS (GN) - 346 - Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs.
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 1962 - 111 - 544, 547.
- WRIGHT (HP), KUBIK (MN), HAYDEN (M) - 180 - Recanalization of thrombosed arteries and anticoagulant therapy.
Brit. Med. J. 1953 - 40 - 1021, 1023.
- UYWILER - 232 - 5 hydroxy tryptophan decarboxylase. I - in vitro inhibition and substrate interaction.
Arch. Biol. Biophys. 1958 - 80 - 162, 173.
- ZÖCKLER (CE), FRICKE (G) - 473 - Tiere experimentelle untersuchungen über die pharmakologische Beeinflussung der leeberdurchblutung durch basich substituierte pteridin.
Arzn. Forsch. 1965 - 15 - 415, 424.
- Anonyme - 112 - Symposium on Psoralen and Radiant energy Kalamazoo 1958.
J. Invest. Dermatol. 1958 - 32 - 131.

S O M M A I R E

AVANT - PROPOS	p.	1
CHAPITRE PREMIER : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : LES		
ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DEJA ETUDIEES DANS		
LA SERIE DES COUMARINES ET HETEROCYCLES APPA-		
RENTES	p.	3
I - HETEROCYCLES DE BASE.....	p.	6
- autour de l'alphapyrone.....	p.	7
- autour de la gammapyrone	p.	9
- autour des parabenzoquinones	p.	11
II - LES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DEJA ETUDIEES	p.	13
SOMMAIRE DES ACTIVITES	p.	14
A - <u>Biosynthèse - Métabolisme - Revues générales</u>	p.	19
B - <u>Agents chimiothérapeutiques</u>	p.	21
- Activité antimicrobienne		
- Activité antifongique		
- Activité antivirale		
C - <u>Agents antiparasitaires</u>	p.	27
- Antimalariques		
- Anthelminthiques		
D - <u>Système nerveux central</u>	p.	29
- Analgésiques	p.	29
- Anticonvulsivants	p.	30
- Hypnotiques	p.	31
- Régulation thermique	p.	31
. Hypothermisants		
. Hyperthermisants.		
- Sédatifs et stimulants centraux	p.	32
E - <u>Système respiratoire</u>	p.	35
F - <u>Musculature striée</u>	p.	36
- Effets antivératriniques.		

G - <u>Peau</u>	p.	37
- Photo-sensibilisation		
H - <u>Sphère sexuelle</u>	p.	40
- Anticonceptionnels		
- Œstrogènes		
I - <u>Cytogénétiques</u>	p.	45
- Radio-protecteurs		
- Anticancéreux.		
J - <u>Excrétion</u>	p.	47
- Diurétiques		
- Uricosuriques		
K - <u>Musculature lisse</u>	p.	49
- Spasmolytiques		
- Anti-histaminiques		
L - <u>Système circulatoire</u>	p.	53
a) Anti-arythmiques	p.	53
b) Coronarodilatateurs	p.	53
c) Anti-athéromateux	p.	57
d) Fragilisation capillaire	p.	58
e) Hypotenseurs	p.	62
M - <u>Crase sanguine - Coagulation</u>	p.	64
- Effet sur les plaquettes		
- Hémostatique		
- Activité antivitaminique K		
. Recherche sur le mode d'action		
. Recherche de molécules nouvelles		

POINT SUR LES RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE CHIMIQUE ET L'ACTIVITE ANTICOAGULANTE

A - <u>Noyau des coumarines</u>	p.	71
a) Groupe des hydroxy coumarines	p.	71
b) Groupe des coumarines non hydroxylées	p.	74
B - <u>Noyau des aryl indane diones</u>	p.	75
C - <u>Noyau des acyl indane diones</u>	p.	80
D - <u>Noyau du naphtalène et de la naphtoquinone 1,4</u>	p.	81
E - <u>Autres noyaux</u>	p.	83

III - CONCLUSIONS DU PREMIER CHAPITRE

DEUXIEME CHAPITRE : PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DE QUELQUES DERIVES DES ALPHA, GAMMA PYRONES ET CORPS VOISINS.....

p. 88

I - INTRODUCTION - PLAN DU CHAPITRE p. 89

II - METHODES D'ETUDE EMPLOYEES DANS LA RECHER-
CHE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE..... p. 92

1 - Mesure de l'activité anticoagulante..... p. 94

A - Critique des méthodes d'étude existantes - les raisons de
notre choix..... p. 94

- Les divers tests utilisables p. 94

- Le choix de l'espèce animale..... p. 97

- Les conditions d'exécution du test..... p. 98

- L'expression de la mesure..... p. 101

B - Protocole suivi - L'expression des résultats..... p. 110

2 - Mesure de l'activité anti-inflammatoire p. 116

A - Etablissement d'une DL 50 approchée per os..... p. 116

B - Mesure du pouvoir anti-phlogistique..... p. 117

- Les méthodes décrites p. 117

- Description des deux méthodes retenues p. 121

a) Oedème plantaire du rat à la carragénine p. 121

b) Erythème aux ultra-violets sur le cobaye p. 125

- Expression des résultats p. 126

III - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE COMPAREE DE QUEL-
QUES ANTICOAGULANTS CONNUS..... p. 128

RESULTATS DE TRIAGE..... p. 129

RECHERCHE D'UNE RELATION DOSE-ACTION POUR
LA PHENINDIONE..... p. 131

- Oedème à la carragénine p. 131

- Erythème aux ultra-violets..... p. 135

ETUDE COMPLEMENTAIRE DE LA PHENINDIONE..... p. 138

- Activité par voie externe p. 138

- Etude du mode d'action p. 141

<u>IV - EXTENSION DE CES RECHERCHES D'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE A DES STRUCTURES CHIMIQUES VOISINES</u>	p. 144
A - Dérivés des gamma pyrones.....	p. 145
B - Dérivés des alpha pyrones	p. 147
1°) Dérivés autres que les hydroxy coumarines.....	p. 147
2°) Les hydroxy coumarines	p. 149
a) Hydroxy coumarines autres que les hydroxy 4 coumarines	p. 149
b) Les hydroxy 4 coumarines	p. 151
c) Les poly hydroxy coumarines.....	p. 154
C - Dérivés des aryl indane diones	p. 156
D - Les acyl indane diones.....	p. 159
E - Divers.....	p. 161
<u>V - DISCUSSION DES RESULTATS</u>	p. 163
A - Considérations sur les relations structure - activité dans la série étudiée	p. 164
B - Hypothèses sur le mode d'action - Importance pratique de cette activité anti-inflammatoire	p. 172
<u>VI - CONCLUSION SUR LE DEUXIEME CHAPITRE</u>	p. 176

TROISIEME CHAPITRE : ETUDE DES PROPRIETES CHOLE-RETQUES DE DERIVES DES INDANE DIONES, ALPHA,

GAMMA PYRONES ET CORPS VOISINS

I - INTRODUCTION - PLAN DU CHAPITRE

II - METHODES D'ETUDE.....

1 - Méthode d'étude de l'activité anticoagulante.....

2 - Méthode d'étude de l'activité cholérétique

A - Revue critique des méthodes existantes - Choix personnel des divers paramètres

a) Etude in vitro et in vivo.....	p. 186
b) Choix de l'espèce	p. 188
c) Souche - Sexe - Poids.....	p. 190
d) Choix de l'anesthésique	p. 191
e) Nature des prélèvements	p. 193
f) Voie d'administration du produit à tester.....	p. 194
g) Les solvants employés	p. 196
h) Choix de la dose des produits à tester	p. 198
i) Durée de l'essai - Importance du lot d'animaux.....	p. 200
j) Expression des résultats	p. 202
α - Variations spontanées du débit biliaire	p. 204
β - Temps de base et seuil significatif de l'élévation de la cholérèse	p. 209
σ - Expression chiffrée de la réponse.....	p. 210
k) Applications - Solvants - Etalons - Choix du coefficient significatif	p. 211
B - Conclusion	p. 213
<u>III - ACTIVITE CHOLERETIQUE DE QUELQUES ANTICOAGU- LANTS CONNUS.....</u>	p. 215
<u>IV - RECHERCHE D'UNE REPONSE HYPERCHOLERETIQUE PARMI LES MOLECULES NOUVELLES</u>	p. 220
A - Dérivés des alpha pyrones	p. 222
B - Coumarines et corps voisins.....	p. 223
C - Coumarines mono hydroxylées hors les hydroxy 4 coumarines	p. 226
D - Hydroxy 4 coumarines	p. 231
E - Di hydroxy coumarines.....	p. 238
F - Aryl 2 indane diones 1,3 et corps voisins	p. 242
G - Acyl 2 indane diones 1,3 et benzoyl 2 indane diones 1,3.....	p. 245
<u>V - DISCUSSION DES RESULTATS</u>	p. 247
1°) <u>Relations entre la structure des molécules et leur activité cholérétique</u>	p. 248
a) Rôle des groupements hydroxylés	p. 249
b) Rôle d'une substitution alkyle	p. 250
c) Rôle des substitutions azotées.....	p. 251
d) Autres : halogénéation - hydrogénation du noyau	p. 256
2°) <u>Séparation des activités anticoagulante et cholérétique</u>	p. 257
<u>VI - CONCLUSIONS.....</u>	p. 261

QUATRIEME CHAPITRE : ETUDE COMPLEMENTAIRE DU DERIVE N°11

<u>I - POINT DE NOS CONNAISSANCES SUR LA METHYL 4 OMBELLIFERONE</u>	p. 268
1°) Caractères physicochimiques essentiels	p. 269
2°) Point des connaissances antérieures.....	p. 269
a) Sur le plan chimique.....	p. 269
b) Sur le plan pharmacologique.....	p. 270
c) Sur le plan analytique.....	p. 271
<u>II - ETUDE COMPLEMENTAIRE DE L'EFFET CHOLERETIQUE DE LA METHYL 4 OMBELLIFERONE</u>	p. 272
1°) Méthodes.....	p. 273
a) Valeur de l'extrait sec biliaire.....	p. 275
b) Dosage de la bilirubine.....	p. 275
2°) Résultats.....	p. 278
3°) Conclusion	p. 283
<u>III - ETUDE DES EFFETS SPASMOLYTIQUES DE LA METHYL 4 OMBELLIFERONE</u>	p. 284
1 - <u>Méthodes d'étude des effets spasmolytiques du corps n° 11</u>	p. 286
A - Méthodes d'étude des effets spasmolytiques dans le domaine viscéral.....	p. 286
1°) Sur organes isolés	p. 286
2°) In situ	p. 288
a) Sur le chien.....	p. 288
b) Sur le lapin	p. 290
B - Méthodes d'étude des effets spasmolytiques dans le domaine vasculaire.....	p. 291
1°) La vasomotricité coronarienne	p. 291
2°) A la périphérie.....	p. 292
a) Mesure des effets tensionnels systémiques sur diverses espèces endormies	p. 293
b) Mesure du débit artériel périphérique.....	p. 293
c) Interférences cardiaques.....	p. 294

C - Méthodes d'étude des effets spasmolytiques au niveau du cholécyste.....	p. 296
1°) Recherche des effets sur la vésicule biliaire	p. 296
a) Méthode de la vésicule isolée du cobaye	p. 296
b) Méthode utilisant la vésicule du chien in situ.....	p. 297
2°) Recherche des effets de la méthyl 4 ombelliférone sur la région oddienne	p. 298
a) Sur le cobaye.....	p. 299
b) Sur le chien.....	p. 302
2 - <u>Résultats des études sur l'effet spasmolytique du corps n° 11.</u>	p. 303
A - Effets spasmolytiques dans le domaine viscéral	p. 303
1°) Sur le duodénum isolé de rat.....	p. 303
2°) Essai in situ	p. 303
a) Sur le chien	p. 303
b) Sur le lapin.....	p. 307
B - Effets spasmolytiques dans le domaine vasculaire	p. 308
1°) Dans le domaine coronaire	p. 308
2°) Dans la circulation générale	p. 308
a) Effets tensionnels systémiques.....	p. 308
b) Effets sur les débits sanguins périphériques.....	p. 309
c) Interférences cardiaques.....	p. 310
C - Etude des effets spasmolytiques au niveau du cholécyste...	p. 311
1°) Sur la vésicule biliaire - Le produit est-il cholagogue?	p. 311
2°) Activité spasmolytique oddienne.....	p. 312
a) Sur le cobaye.....	p. 312
1 - Effet de la méthyl 4 ombelliférone injectée en I.V sur le sphincter d'Oddi contracté par la morphine.	p. 312
2 - Activité entérale de la méthyl 4 ombelliférone sur le sphincter d'Oddi contracté	p. 314
3 - Effets de la méthyl 4 ombelliférone sur les cholécystes normalement hypertoniques.....	p. 315
4 - Etude de l'effet des spasmolytiques majeurs ou cholérétiques reconnus	p. 318
5 - Activité de la méthyl 4 ombelliférone sur un contracturant non morphinique du cholécyste....	p. 322
b) Sur le chien	p. 329
3 - <u>Conclusion sur l'étude des effets spasmolytiques du corps n°11.</u>	p. 333

IV - HYPOTHESES SUR LES MECANISMES D'ACTION DU CORPS N° 11.....	p. 335
1°) <u>Les mécanismes de l'hypercholérèse - le cas de la méthyl 4 ombelliférone</u>	p. 336
A - Le débit biliaire peut s'élever lorsque le débit sanguin hépatique s'accroît - Est-ce le cas du corps n° 11 ?	p. 336
B - Le système nerveux autonome est-il impliqué dans la ré- ponse cholérétique à la drogue ?	p. 337
C - Thermogénèse, biligénèse et corps n° 11.....	p. 340
D - La voie biliaire est-elle une des voies d'élimination du corps n° 11 ?	p. 341
1 - Méthode d'étude de l'excrétion biliaire du produit.....	p. 341
α - Protocole	p. 341
β - Dosage du dérivé libre.....	p. 342
γ - Dosage du glycuconjugué	p. 343
δ - Caractérisation du corps n° 11	p. 343
2 - Résultats.....	p. 345
2°) <u>Le pouvoir spasmolytique oddien de la substance n° 11 - Tentatives d'explication du mode d'action</u>	p. 349
A - Des raisons anatomiques permettent-elles d'expliquer cette localisation des effets de la méthyl 4 ombelliférone	p. 349
B - Activité oddienne et structure chimique.....	p. 350
C - Morphine et région oddienne	p. 351
D - L'altération des mécanismes adrénergiques, dont celle des médiateurs sympathiques est-elle en cause ?	p. 351
. Méthode.....	p. 352
. Résultats.....	p. 353
E - L'hyperpression cholérétique permet-elle d'expliquer l'ou- verture du sphincter d'Oddi ?	p. 355
F - Peut-on invoquer essentiellement l'effet papavérinique mus- culotrope ?	p. 358
G - Le produit peut-il agir in situ sur les fibres musculaires du bas cholédoque et du sphincter d'Oddi ?	p. 359
a) Dispositions expérimentales	p. 359
b) Résultats.....	p. 362
- Sur le cobaye.....	p. 362
- Sur le chien	p. 365
c) Conclusion	p. 366
H - Peut-on invoquer aussi un effet de la substance par voie systémique ?	p. 369

<u>V - CONCLUSION DE NOS ETUDES SUR LA METHYL 4</u> <u>OMBELLIFERONE</u>	p. 371
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	p. 374
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 377
<u>SOMMAIRE</u>	p. 423

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

DONNEES RECENTES SUR LA BRADYKININE

Vu :
Les Membres du Jury

Vu et approuvé
Le Doyen de la Faculté des Sciences
J. BRACONNIER

Messieurs : G. PERES
B. DREVON
G. FAUCON
R. FONTANGES

Vu et accordé le permis d'imprimer :
Lyon, le 24 Mai 1968

Le Recteur
Président du Conseil de l'Université
P. LOUIS

